

Aus der Klinik für Neurochirurgie

der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Endotheliale Inflammation und Zusammenbruch der Bluthirnschranke nach experimentell induzierter Subarachnoidalblutung

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Josephin Wagner

aus Frankfurt (Oder)

Datum der Promotion: 05.03.2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Wagner J, Blecharz KG, Schneider UC, Winkler L, Vajkoczy P. Role of interleukin-6 in the brain endothelial dysfunction after SAH. Abstractband der 66. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, 07 – 10. Juni 2015, Karlsruhe. <http://www.egms.de/static/de/meetings/dgnc2015/15dgnc295.shtml>.

Blecharz-Lang KG, Wagner J, Fries A, Nieminen-Kelhä M, Rösner J, Schneider UC, Vajkoczy P. Interleukin 6- mediated endothelial barrier disturbances can be attenuated by blockade of the IL6 receptor expressed in brain microvascular endothelial cells. Translational Stroke Research, February 2018. <https://doi.org/10.1007/s12975-018-0614-2>.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis/ Tabellenverzeichnis	VIII
Abstrakt	X
1. Einleitung	1
1.1 Definition und Epidemiologie der SAB	1
1.2 Pathophysiologie nach aSAB	2
1.2.1 Zerebrale Autoregulation	2
1.2.2 Frühe zerebrale Schädigung nach aSAB	3
1.2.3 Späte zerebrale Schädigung nach aSAB	5
1.3 Das Endothel und seine Eigenschaften	7
1.3.1 Definition und Eigenschaften der Bluthirnschranke.....	7
1.3.2 Occludenskontakte (Tight Junctions, TJs).....	9
1.3.3 Adhärenskontakte (Adherens Junctions, AJs).....	10
1.4 Essenzielle Zytokine und Neuroinflammation.....	12
1.4.1 IL1 β und TNF α im ZNS	13
1.4.2 Transsignalweg des IL6-Rezeptors und die Expression im ZNS.....	15
1.5 Neuroinflammation und BHS-Schädigung unter Einfluss von IL6.....	17
1.6 Ziel der Arbeit.....	20
2. Materialien und Methoden	21
2.1 Materialien und Geräte.....	21
2.1.1 Reagenzien, Chemikalien, Puffer.....	21
2.1.2 Antikörper.....	23

2.1.3 Primer für quantitative real-time RT-PCR	24
2.2. Tierexperimentelles Arbeiten.....	25
2.2.1 Umgang und Pflege der Versuchstiere	25
2.2.2 Stamm und Eigenschaften der Versuchstiere	25
2.2.3 Fadenperforationsmethode zur Induktion einer eSAB	25
2.2.4 Intrakardiale Perfusion.....	27
2.3 Biochemische Methoden	28
2.3.1 Anfertigen von Gefrierschnitten am Kryostat	28
2.3.2 Fixierung und Vorbereitung der Gefrierschnitte.....	28
2.3.3 Immunfluoreszenzfärbung.....	29
2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	29
2.3.5 Herstellen von Gehirn-Homogenaten	30
2.3.6 Isolierung und Immunhistochemie von Gehirnkapillaren	31
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	32
2.4.1 RNA Extraktion von In-vivo-Gewebe	32
2.4.2 Herstellen von cDNA über reverse Transkription	32
2.4.3 Semiquantitative realtime qRT-PCR	33
2.5 Zellkulturmethoden	34
2.5.1 Kultivierung der immortalisierten Hirnendothelzelllinie cEND	34
2.5.1.1 Kultivierung und Aussaat.....	34
2.5.1.2 Mediumwechsel.....	35
2.5.1.3 Beschichtung der Kulturgefäße.....	35
2.5.1.4 Subkultivieren der cEND-Zelllinie	35
2.5.1.5 Kryokonservierung.....	36
2.5.1.6 Auftauen von kryokonservierten Zellen	36

2.6 Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes	36
2.7 Behandlung der cEND-Zellen mit rIL6	37
2.8 RNA Extraktion von Zellkulturen mittels Ambion® RNA-Kit.....	37
3. Ergebnisse.....	38
3.1 Ausschluss intrazerebraler Blutungen und Verletzungen nach eSAB	38
3.1.1 Makroskopische Begutachtung	38
3.1.2 Histologie mittels HE-Färbung	39
3.2 Zusammenbruch der BHS nach eSAB	40
3.2.1 Parenchymale Anreicherung von Evans blue.....	40
3.2.2 Quantitativer Nachweis der Extravasation von Evans blue	41
3.2.3 Immunhistochemie perivaskulärer Extravasation von Evans blue.....	41
3.3 Expressionsprofil der TJs Moleküle Cld5 und Ocld als molekulare Ursache des BHS-Zusammenbruchs nach eSAB.....	42
3.3.1 Regulation der Genexpression von Cld5 in BHS-Kapillaren	43
3.3.2 Regulation der Genexpression von Ocld in BHS-Kapillaren	43
3.3.3 Immunhistochemie von Cld5 nach eSAB	44
3.3.4 Immunhistochemie von Ocld nach eSAB	46
3.4 Die Expression proinflammatorischer Zytokine nach eSAB.....	48
3.4.1 Überexpression von TNF α , IL1 β und IL6 nach eSAB	48
3.4.2 Anreicherung von IL6 Vesikeln im Gehirndothel nach eSAB.....	49
3.5 IL6 als Ursache des Zusammenbruchs der Hirndothelzellbarriere.....	51
3.5.1 Die cEND-Zellviabilität unter dem Einfluss von rIL6.....	51
3.5.2 Zeitabhängige Reduktion der cEND-Zellviabilität unter rIL6	52
3.5.3 Reduktion des TEER im zeitlichen Verlauf unter rIL6	52
3.5.4 Einfluss von rIL6 auf die Genexpression von Cld5 und Ocld in cEND-Zellen.....	53

4. Diskussion	55
4.1 Eignung und kritische Aspekte des Fadenperforationsmodells	56
4.2 Evans blue Extravasation als initiales Indiz eines BHS-Defekts nach eSAB	58
4.3 Permeabilitätsstörung der Endothelzellbarriere In vitro.....	60
4.4 Die Expression von Cld5 und Ocl4 im Endothelzellverband	60
4.5 Neuroinflammation im Endothel nach eSAB.....	63
4.6 Die endotheliale Expression des IL6R im Gehirn	68
4.7 Ausblick.....	70
5. Literaturverzeichnis.....	72
6. Eidesstattliche Versicherung	87
7. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen	88
8. Lebenslauf	91
9. Publikationsliste	92
10. Danksagung	93

Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria
Abb	Abbildung
ACA	A. cerebialis anterior
AG	Arbeitsgemeinschaft
AJ	<i>engl.</i> Adherens Junction
aSAB	aneurysmatische Subarachnoidalblutung
BHS	Bluthirnschranke
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CBF	<i>engl.</i> cerebral blood flow = zerebraler Blutfluss
CCA	<i>engl.</i> Common Carotid Artery = A. carotis communis
CD31	<i>engl.</i> cluster of differentiation 31
cDNA	<i>engl.</i> complementary DNA
cEND	<i>engl.</i> brain microvascular endothelial cell line = mikrovaskuläre Hirnendothelzelllinie
Cld5	Claudin 5
CPP	<i>engl.</i> cerebral perfusion pressure = zerebraler Perfusionsdruck
CRP	reaktives Protein C
CT	cycle threshold
CVP	<i>engl.</i> Cerebral Venous Pressure = Zerebraler Venendruck
CVR	<i>engl.</i> cerebral vascular resistance = zerebraler Gefäßwiderstand
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCI	<i>engl.</i> Delayed Cerebral Ischemia = späte zerebrale Ischämie
DIND	<i>engl.</i> Delayed Ischemic Neurological Deficit = verzögertes ischämisches neurologisches Defizit
DMEM	<i>engl.</i> Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
EBI	<i>engl.</i> Early Brain Injury = akute Hirnschädigung
ECA	<i>engl.</i> External Carotid Artery = A. carotis externa
EDTA	Ethylenediamine tetra-acetic acid
ELISA	<i>engl.</i> Enzyme-linked Immunosorbent Assay= Enzym gebundenes antikörperbasiertes Nachweisverfahren
engl	englisch
eSAB	experimentelle Subarachnoidalblutung
ET1	Endothelin-1
et al.	et alia
FCS	<i>engl.</i> Fetale Calv Serum = fetales Kälberserum
GABA	<i>engl.</i> Gamma-aminobutyric acid = γ -Aminobuttersäure
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GCS	Glasgow Coma Scale
GP	Glykoprotein
GPCR	<i>engl.</i> G protein-coupled receptor = G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
HBSS	<i>engl.</i> Hank's Balanced Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICA	<i>engl.</i> Internal Carotid Artery = A. carotis interna
ICAM	<i>engl.</i> intercellular adhesion molecule

ICB	intrazerebrale Blutung
ICP	<i>engl.</i> intracranial pressure = intrakranieller Druck
IL	Interleukin
IL1 β	Interleukin 1 beta
IL6	Interleukin 6
IL6R	Interleukin 6 Rezeptor
sIL6R	<i>engl. soluble</i> Interleukin 6 Rezeptor
JAK	<i>engl.</i> c-Jun N-terminal kinase
M.	Morbus
MAP	<i>engl.</i> middle arterial pressure = mittlerer arterieller Druck
MMP9	Matrixmetalloprotease 9
mRNA	<i>engl.</i> messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromidefor
Ocln	Occludin
PBS	<i>engl.</i> Phosphate Buffered Saline
PCR	<i>engl.</i> polymerase chain reaction
PECAM	<i>engl.</i> Platelet endothelial cell adhesion molecule
PSGL	<i>engl.</i> P- Selectin Glycoprotein Ligand
qRT	<i>engl.</i> Quantitative Reverse Transcription
r	rekombinant
RFU	<i>engl.</i> relative fluorescence units
RNA	<i>engl.</i> Ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAB	Subarachnoidalblutung
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Tab	Tabelle
TEER	<i>engl.</i> Transendothelial electrical resistance = elektrischer transendothelialer Widerstand
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TJ	<i>engl.</i> Tight Junction
VEC	<i>engl.</i> Vascular Endothelial Cadherin
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
ZO1	Zonula occludens 1

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die multifaktoriellen Mechanismen der EBI nach aSAB führen zur Apoptose	4
Abb. 2: Die neurovaskuläre Einheit und ihre zellulären Komponenten.....	9
Abb. 3: Endotheliale Adhärens- und Occludenskontakte zwischen zwei Endothelzellen	12
Abb. 4: Der IL6 Ligand aktiviert den JAK/STAT Signalweg	17
Abb. 5: Fadenperforationsmethode zur Induktion der eSAB an der Maus	27
Abb. 6: Makroskopische Blutverteilung unmittelbar nach eSAB Induktion	39
Abb. 7: HE-Färbung als mikroskopischer Nachweis einer erfolgreich induzierten eSAB	39
Abb. 8: Makroskopische Darstellung der Extravasation von Evans blue.....	40
Abb. 9: Quantitativer Nachweis der Extravasation von Evans blue nach eSAB.....	41
Abb. 10: Parenchymale Extravasation von Evans blue nach eSAB an Tag 4.....	42
Abb. 11: Regulation der Genexpression von Cld5 an isolierten Gehirnkapillaren.....	43
Abb. 12: Regulation der Genexpression von Ocld an isolierten Gehirnkapillaren.....	44
Abb. 13: Immunhistochemie von Cld5 nach eSAB	45
Abb. 14: Quantitative Analyse der Proteinexpression von Cld5.....	46
Abb. 15: Immunhistochemie von Ocld nach eSAB	47
Abb. 16: Quantitative Analyse der Proteinexpression von Ocld.....	47
Abb. 17: Überexpression von TNF α , IL1 β und IL6 nach eSAB.....	49
Abb. 18: Akkumulation perivaskulärer IL6-Vesikel entlang von Gehirnkapillaren nach eSAB	50
Abb. 19: Konzentrationsreihe von rIL6 und Ermittlung der cEND-Zellviabilität	51

Abb. 20: Verminderte Zellviabilität unter rIL6-Behandlung im zeitlichen Verlauf.....52
Abb. 21: TEER unter rIL6-Gabe im zeitlichen Verlauf.....53
Abb. 22: Genexpression der TJs Cld5 und Ocld unter rIL6-Einfluss.....54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusätze und Chemikalien21
Tabelle 2: Reagenzien22
Tabelle 3: Puffer und Medien22
Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper für Immunhistochemie23
Tabelle 5: Primer24
Tabelle 6: Zelllinie und Kulturbedingungen34

Abstrakt (Deutsch)

Eine akute aneurysmatische Subarachnoidalblutung (aSAB) zählt zu den hämorrhagischen Schlaganfällen und beziffert eine jährliche Inzidenz von sechs bis elf von hunderttausend Menschen. Hauptgrund ist die Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas, gefolgt von einer Einblutung in den Subarachnoidalraum. Das durchschnittliche Alter bei aSAB-Patienten beträgt fünfundfünfzig Jahre und ist somit niedriger als bei Patienten mit einem ischämischen Schlaganfall. Diesbezüglich ist die sozioökonomische Belastung der aSAB vergleichsweise hoch.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass eine aSAB zu einem Zusammenbruch der Bluthirnschranke (BHS) führt, wodurch ein vasogenes Hirnödem ausgelöst wird. An Patienten nach aSAB konnte außerdem gezeigt werden, dass IL6 im Serum und im Liquor erhöht war, wobei diese Patienten ein schlechteres Outcome aufzeigten. Die frühe Hirnschädigung nach aSAB beginnt bereits nach einem initialen intrazerebralen Druckanstieg, gefolgt von einem Abfall des zerebralen Perfusionsdrucks. Experimentelle Studien widmen sich daher den Mechanismen der frühen Hirnschädigung nach aSAB mit Fokus auf Störungen der mikrovaskulären Ebene und inflammatorischen Prozessen innerhalb ZNS nach aSAB. Die hier vorgelegte Arbeit konzentrierte sich auf die Rolle des Zytokins Interleukin-6 (IL6) und seine Effekte auf die BHS nach experimenteller Subarachnoidalblutung (eSAB) in Mäusen.

Um die Induktion einer eSAB an der Maus auslösen zu können, wurde die Methode der Fadenperforationstechnik angewandt. Die darauffolgenden Experimente dienten der Analyse der BHS-Eigenschaften, wobei sich nach eSAB ein deutlicher BHS-Zusammenbruch über den gesamten zeitlichen Verlauf der Experimente zeigte. Als molekulares Korrelat für den Untergang der BHS konnte die zwei wichtigsten *tight junction* (TJ) Moleküle Claudin-5 (Cld5) und Occludin (Ocln) identifiziert werden. Zeitgleich wurde eine Überexpression essenzieller Zytokine beobachtet. Insbesondere IL6 zeigte zu allen Zeitpunkten eine deutliche Hochregulierung an isolierten Gehirnkapillaren nach eSAB. Somit wurde nachgewiesen, dass IL6 endothelzellspezifisch in Vesikeln isolierter Gehirnkapillaren nach eSAB angereichert wird. Weiterführende In-vitro-Versuche ergaben einen deutlichen Verlust des transendothelialen Widerstandes in der cEND-Zellkultur, nachdem die Zellen mit dem rekombinanten IL6 (rIL6) behandelt wurden. Auch In vitro war ein Untergang von Cld5 und Ocln zu beobachten.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit erstmalig die Expression von IL6 im zerebralen Endothel nach eSAB, was zeitgleich mit einem BHS-Zusammenbruch korrelierte. Abschließend soll die Rolle von IL6 in Bezug auf die frühe Hirnschädigung nach aSAB diskutiert und der Frage nachgegangen werden, ob ein Knockout von IL6 oder die externe Blockade von IL6 und seinem Rezeptor einen signifikanten Effekt auf den Pathomechanismus nach aSAB aufweist.

Abstract (English)

Acute aneurysmal subarachnoid hemorrhage (aSAH) is a type of hemorrhagic stroke with an annual incidence of six to eleven out of a hundred thousand people. The main cause of an aSAH is a rupture of an intracranial aneurysm, which is followed by a bleeding into the subarachnoid space. The average age in aSAH patients is fifty-five years old, which is much younger than the average age of patients with ischemic stroke. Therefore, the socio-economic impact of aSAH is comparatively high.

Numerous studies have shown, that aSAH leads to a breakdown of the blood brain barrier (BBB), causing a vasogenic brain edema. Patients with aSAH also show an increase in IL6 in serum and in cerebrospinal fluid, resulting in worse outcomes for aSAH patients. Early brain injury after aSAH occurs after an initial increase in intracerebral pressure, followed by a decrease in cerebral perfusion pressure. Therefore, current experimental studies are devoted to mechanisms of early brain damage, investigating microvascular changes and BBB breakdown with a focus on CNS inflammation after aSAH. The following work examines interleukin-6 (IL6) and its effects on the BBB after experimental subarachnoid hemorrhage (eSAH) in mice.

In order to induce eSAH in mice, the filament perforation method was used. The subsequent experiments were performed to analyze BBB properties, showing a BBB breakdown over the course of the experiment. The decline of the most important tight junction (TJ) molecules Claudin-5 (Cld5) and Occludin (Ocln) caused a BBB collapse. Moreover, the overexpression of crucial cytokines was observed, while IL6 in particular was increased in isolated brain capillaries after eSAH, showing enriched expression in endothelial cells. Further in-vitro experiments revealed a significant loss of transendothelial resistance in the cEND cell culture after the cells were treated with the recombinant IL6 (rIL6). Finally, the gene expression of Cld5 and Ocln was also decreased in vitro.

In summary, this work shows for the first time that IL6 is expressed in the BBB after eSAH, correlating with a BBB breakdown. The role of IL6 in relation to early brain injury after aSAH will be discussed, focusing on the effect of a knockout and an external blockade of IL6 towards the pathomechanism after aSAH.

1. Einleitung

1.1 Definition und Epidemiologie der SAB

Die Subarachnoidalblutung (SAB) zählt zu den hämorrhagischen Schlaganfällen und stellt eine lebensbedrohliche Situation für den Patienten dar (Mahajan, 2017; D'Souza, 2015). Eine SAB beschreibt die schlagartige Ansammlung von arteriellem Blut innerhalb des Subarachnoidalraumes, welcher von den beiden Gehirnhäuten Pia mater und Arachnoidea begrenzt wird. Die Blutung befindet sich intrakraniell und ist außerhalb des Gehirnparenchyms lokalisiert. Eine SAB kann traumatisch und spontan auftreten. Tritt eine SAB aufgrund einer spontanen Ruptur eines Gefäßaneurysmas auf, so spricht man von einer aneurysmatischen SAB (aSAB). Ungefähr sechs bis elf von hunderttausend Menschen mit einem Durchschnittsalter von fünfundfünfzig Jahren leiden an einer spontanen aSAB durch die Ruptur eines Aneurysmas, wobei diese Ziffer variiert und von Alter, Geschlecht und Land anhängig ist (Etminan, 2019). Die bekanntesten Risikofaktoren sind Nikotin- und Alkoholabusus, sowie eine unbehandelte Hypertonie und andere medizinische Komorbiditäten. Seltener Faktoren wie arteriovenöse Malformationen und genetische Prädispositionen stellen zusätzliche Ursachen dar (Bederson et al., 2009). Wie bei anderen Gefäßsystemen im menschlichen Organismus sind insbesondere Gefäß-Bifurkationen Prädilektionsstellen für Aneurysmen. Bei der aSAB bilden sich Aneurysmen zu 85 % im vorderen Teil und zu 15 % im hinteren Teil des gefäßversorgenden Gehirnkreislaufes, den sogenannten Circulus arteriosus cerebri oder auch Circulus Willisii genannt. Die Einblutung ist somit in den basalen Zisternen der Schädelbasis lokalisiert. Das schlagartig austretende Blut sammelt sich je nach Ausmaß der aSAB im gesamten subarachnoidalen Raum an, welcher durch Liquor cerebrospinalis gefüllt ist (Van Gijn, & Rinkel 2001). Anatomisch gesehen ist dieser Raum zusätzlich auf Höhe des vierten Ventrikels mit den inneren Liquorräumen über die Foramina Luschkae und das Foramen Magendii verbunden. Das subarachnoidale Blut kann sich daher auch je nach Druckanstieg bis in das innere Ventrikelsystem ausbreiten (Plesnila, 2013; Van Gijn, & Rinkel 2001). Obwohl die aSAB nur einen Anteil von 5–6 % aller Schlaganfälle einnimmt, kehren nur 30 % aller Patienten ohne ein schweres Langzeitdefizit in den Alltag zurück (Martin & Rymer, 2011; Petridis et al., 2017). Das hohe Maß an Mortalität und Morbidität stellt eine starke sozioökonomische Belastung für die Gesellschaft dar. Insbesondere die häufig jungen aSAB-Patienten sind mitunter Monate bis Jahre auf Rehabilitation angewiesen und können ihre vorherige Tätigkeit

nicht mehr oder nur teilweise ausführen (Eagles et al., 2019; Al-Khindi et al., 2010).

1.2 Pathophysiologie nach aSAB

Um vorab die Zusammenhänge für die pathophysiologischen Mechanismen des zerebralen Blutflusses und die Druckverhältnisse im Gehirn nach aSAB zu verdeutlichen, sind die Erläuterungen folgender Fachtermini von Bedeutung: Intrazerebraler Druck (engl. *Intracerebral Pressure*, ICP), zerebraler Blutfluss (engl. *Cerebral Blood Flow*, CBF), zerebraler Perfusionsdruck (engl. *Cerebral Perfusion Pressure*, CPP), mittlerer arterieller Druck (engl. *Middle Arterial Pressure*, MAP) und zentraler Venendruck (engl. *Cerebral Venous Pressure*, CVP).

1.2.1 Zerebrale Autoregulation

Die zerebrale Autoregulation ist für eine konstante Aufrechterhaltung des CBF von essenzieller Bedeutung. Der CPP wird über die Differenz des MAP und des ICP berechnet ($CPP = MAP - ICP$). Der errechnete CPP-Wert wird anschließend durch den zerebralen Gefäßwiderstand (CVR) dividiert, woraus sich der CBF-Wert ergibt ($CBF = CPP/CVR$) (Armstead, 2016). Der CBF beträgt unter normotensiven Bedingungen ungefähr 50 ml pro 100 g Gehirnmasse. Die zerebrale Autoregulation ermöglicht die Aufrechterhaltung des CBF über kompensatorische Effekte auf mikrovaskulärer Ebene. Im Falle eines MAP- oder CPP-Anstiegs erhöht sich der Widerstand über eine Vasokonstriktion der kleinen Gehirngefäße. Kommt es zu einem Abfall von einem der beiden Drücke, so erfolgt durch die Vasodilatation die Senkung des Widerstandes der Gefäßwände. Für gesunde Erwachsene ist die Aufrechterhaltung eines konstanten CBF bei Werten zwischen 50 und 150 mmHg für den CPP und 60 bis 160 mmHg für den MAP gewährleistet (Armstead, 2016). Darüber hinaus steht der CBF in Abhängigkeit mit dem ICP. Laut der Monro-Kellie Theorie ist der ICP von den drei Volumina Gehirn (80 %), Blut (12 %) und Liquor (8 %) abhängig (Mokri, 2001). Diese zweihundert Jahre alte Theorie besagt, dass eine Volumenänderung von Blut, Liquor oder Gehirnmasse eine reziproke Volumenänderung der jeweils anderen Komponente verursacht. Ist eine kompensatorische Volumenumverteilung erschöpft oder gar unmöglich, kommt es folglich zu einem ICP-Anstieg. Normale ICP-Werte belaufen sich auf 5 bis 15 mmHg (Wilson, 2016; Mokri, 2001).

Bei der plötzlichen Ruptur eines Aneurysmas tritt Blut aus dem Gefäß in den Subarachnoidalraum über, wodurch der ICP innerhalb von Sekunden bis Minuten auf Werte des MAP ansteigt. Aufgrund des enormen Druckanstiegs um mitunter das Zehnfache des Ausgangsdrucks, kommt es durch die Kompression der zerebralen Blutgefäße zum Erliegen der Blutzirkulation im Gehirn, gefolgt von einem Absinken des CPP und des CBF. Das Sinken des CPP führt zu einer Bewusstseinsstörung oder Bewusstlosigkeit bis hin zum Koma bei aSAB-Patienten (Budohoski et al., 2013). Nach wenigen Minuten fällt der ICP bereits deutlich, bleibt jedoch häufig auf einem höheren Ausgangswert über längere Zeit konstant bestehen (Grote & Hassler, 1988). Patienten mit ICP-Werten über 20 mmHg über einen längeren Zeitraum zeigten eine signifikant erhöhte Mortalität (Lombardo et al., 2013).

Heutzutage ist bekannt, dass auch andere Parameter den ICP beeinflussen wie beispielsweise Schwankungen im zerebralen arteriellen Einstrom und dem venösen Ausstrom. Diesbezüglich ist die Untersuchung des arteriösen sowie venösen Blutstromes bei der Erforschung der zerebralen Autoregulation von Bedeutung (Wilson, 2016).

1.2.2 Frühe zerebrale Schädigung nach aSAB

Es besteht kein klarer Konsens über eine einheitliche Definition in der Literatur, der die frühe zerebrale Hirnschädigung (engl. *Early Brain Injury*, EBI) nach aSAB beschreibt, wodurch sich verschiedene Ansätze entwickelt haben, um die EBI nach aSAB zu definieren. Allgemein gesagt umfasst die EBI die ersten zweiundsiebzig Stunden nach aSAB, wobei die Schädigung des Gehirnes vom Zeitpunkt der subarachnoidalen Einblutung bis hin zum Eintreten einer Gefäß-Kontraktion großlumiger Gefäße, den sogenannten Makrovasospasmus beschrieben wird (Al-Khindi et al., 2010; Cahill et al., 2006; Ostrowski et al., 2006). Es ist davon auszugehen, dass eine Hirnverletzung bereits durch den plötzlichen Anstieg des Hirndrucks (ICP) aufgrund der Extravasation von Blut in den Subarachnoidalraum verursacht wird. Die Beeinträchtigung der zerebralen Perfusion (CPP) und der Autoregulation kann zu einer globalen Ischämie führen. Darüber hinaus, verursacht der hypoxische Zustand ein Ungleichgewicht im zerebralen Energieverbrauch, was sich auf alle Zellen des Gehirns auswirkt, wobei insbesondere Neuronen- und Endothelzellschäden zu einem zytotoxischem Ödem und zum Abbau der BHS führen.

Letztendlich führt der Stillstand der Energieversorgung zu einer weiteren Apoptose von Nervengewebe und oxidativem Stress (Rass & Helbok 2019; Budohoski et al., 2013). Die Apoptose von Endothelzellen verursacht eine erhöhte Diffusion zwischen dem vaskulären Lumen und dem Gehirnparenchym, wodurch sich neben einem zytotoxischen Ödem auch ein vasogenes Ödem in den ersten zweiundsiebzig Stunden bilden kann, wobei im Allgemeinen ein zytotoxisches Ödem mit einer schwereren Hirnschädigung in Verbindung gesetzt wird (Weimer et al., 2017). Schneider et al. konnten in unserer Arbeitsgruppe nachweisen, dass nach experimenteller SAB (eSAB) eine Inflammationskaskade durch die Aktivierung von Gliazellen wie Astrozyten und Mikroglia angestoßen wird.

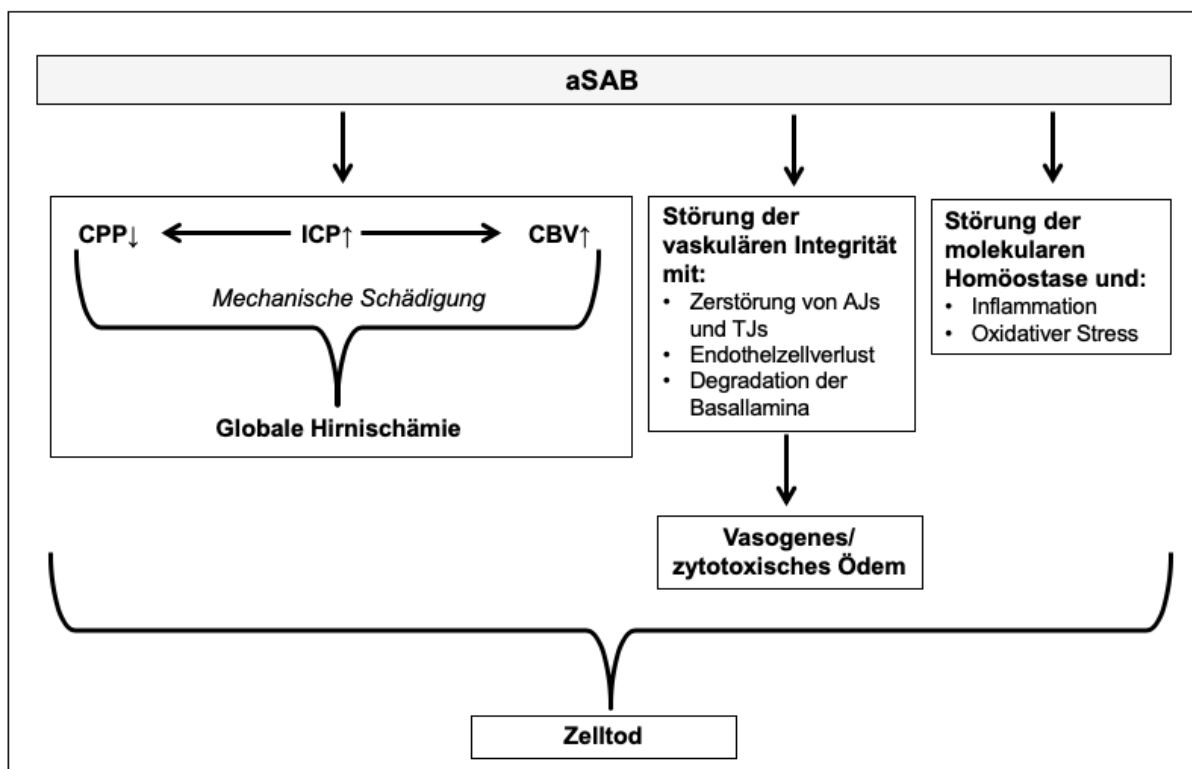


Abb. 1: Die multifaktoriellen Mechanismen der EBI nach aSAB führen zur Apoptose. Die akute globale Ischämie wird durch die abrupten Druckunterschiede ausgelöst. Es folgen ein Ungleichgewicht von Ionen, eine Schädigung von Endothelzellen mit umliegenden Strukturen und die Entstehung von oxidativem Stress sowie Inflammation.

Hierbei werden proinflammatorische Zytokine freigesetzt, die eine Inflammation des Gehirnes nach eSAB verursachen. Die Inflammation findet in verschiedenen Kompartimenten, wie dem Gehirnparenchym als auch den zerebralen Blutgefäßen statt, wobei unklar ist, welche Mechanismen eine vaskuläre Inflammation erzeugen (Schneider et al., 2015). Die multifaktoriellen Genese der EBI führt zu Beginn der aSAB

zu einem Anstieg des ICP und zu einem Abfall des CBF und CPP, gefolgt von Apoptose und BHS-Zusammenbruch, wie in Abbildung (Abb) 1 dargestellt wird. Dennoch sind die pathophysiologische Mechanismen im Zusammenhang mit EBI und aSAB nicht ausreichend erforscht und es existiert keine spezifische Behandlung für Patienten, um das Auftreten der EBI adäquat zu therapieren. Experimentelle Daten lassen sich häufig schwer auf die Klinik übertragen. Dennoch liefern Tierstudien überzeugende Hinweise auf neuronale Schädigung innerhalb von Minuten nach eSAB, die durch Hypoxie des Hirngewebes, durch zerebrale Entzündung und einen Untergang der BHS ausgelöst wurden (Sehba et al., 2012). Die Überwachung derartiger Ereignisse ist beim Menschen in der sehr frühen Phase eine klinische Herausforderung. Invasive multimodale Neuromonitoring-Geräte ermöglichen bereits innerhalb der ersten Stunden eine kontinuierliche Datenerfassung über ICP, Sauerstoffsättigung des Gehirns (PbtO₂) und zerebralen Blutfluss der aSAB-Patienten (Stuart et al., 2010). Unter Verwendung von Mikrodialyse-Daten und CT-Bildgebung konnte die Gruppe um Helbok et al. an den ersten Tagen nach aSAB ein globales Hirnödem, eine Störung des Gehirnstoffwechsels, einschließlich eine Erhöhung des entzündungsfördernden Zytokins Interleukin-6 (IL6), was auf eine BHS-Störung hindeutete, sowie vermehrte Episoden einer Hirnhypoxie feststellen (Helbok et al., 2015).

Multimodale Neuromonitoring-Techniken bieten Einblick in pathophysiologische Veränderungen in der frühen Phase nach aSAB und können für zukünftige Interventionen verwendet werden, um EBI bei aSAB-Patienten besser verstehen und untersuchen zu können (Helbok et al., 2015).

1.2.3 Späte zerebrale Schädigung nach aSAB

Die späte zerebrale Schädigung gehört zu den am meisten gefürchteten Komplikation nach einer aSAB. Trotz erheblicher Fortschritte im Bereich der Neurointensivmedizin, bleibt die späte zerebrale Schädigung eine Hauptursache für erhöhte Mortalität und Morbidität mit verlängerten Aufenthalten auf Intensivstation und enormen gesundheitlichen Kosten. Bis zu 30 % der aSAB-Patienten sind von einer späten Hirnschädigung betroffen, wobei die Mehrheit der Überlebenden kognitive und motorische Defizite, abhängig von der Schwere und der Lokalisation der Schädigung, aufweist (Francoeur & Mayer 2016). Nachdem die aSAB-Patienten die initiale Blutung und die EBI überlebt haben, besteht ab dem vierten Tag nach aSAB dennoch das

Risiko, eine späte zerebrale Schädigung zu entwickeln (A. S. Sarrafzadeh et al., 2014). In der Literatur wird meistens von später zerebraler Ischämie (engl. *Delayed Cerebral Ischemia*, DCI) gesprochen, worauf ein verzögertes ischämisches neurologisches Defizit (engl. *Delayed Ischemic Neurological Deficit*, DIND) folgen kann. Hierbei ist die Ischämie in der Ausprägung sehr unterschiedlich und kann sich bis zu multifokalen Hirninfarkten ausdehnen. Bei der Diagnosestellung des DIND müssen andere Ursachen wie Hydrozephalus, Infektionen, Elektrolyt- oder metabolische Störungen ausgeschlossen werden. Insbesondere für komatöse Patienten ist die Evaluierung eines neuen DIND jedoch oftmals schwierig und ohne bildgebende Verfahren mitunter unmöglich (Yamaki et al., 2019).

Hippokrates Aphorismus über den vorhergesagten Tod am siebten Tag nach initialer Bewusstlosigkeit und Kopfschmerzen schilderte wohlmöglich schon vor 2400 Jahren die Pathophysiologie der späten Hirnschädigung nach aSAB (Zhang et al., 2009). Die von Ecker und Riemenschneider durchgeführte Arteriographie konnte 1951 erstmals einen Vasospasmus erfolgreich am Patienten darstellen (Ecker & Riemenschneider, 1951). Es folgten klinische und experimentelle Studien, die die Genese und die Auswirkung der zerebralen Gefäßkrämpfe erforschen sollten. Heute wissen wir, dass bereits ab dem dritten Tag nach aSAB ein Vasospasmus beobachtet werden kann. Hierbei ist die Dauer sehr variabel und kann Wochen andauern, wobei häufig ein Maximum des Ausmaßes innerhalb der ersten Woche nach aSAB zu beobachten ist (Daou et al., 2019).

Die DCI wurde über Jahrzehnte als fatale Folge des Vasospasmus nach aSAB betrachtet. Ein selektiver Endothelin-Rezeptor Typ A Antagonist (Clazosentan), 2008 entwickelt von Actelion, zeigte in der Multicenter Studie CONSCIOUS-1 eine effektive Reduktion des Vasospasmus um bis zu 65 % nach aSAB. Jedoch war weder eine Verbesserung des klinischen *Outcomes* noch eine verringerte Mortalität nach aSAB feststellbar (MacDonald et al., 2008). Die Studie wurde in der Phase 3 (CONSCIOUS-2) durch den ausbleibenden Erfolg, einen potenten Therapieansatz gegen den Vasospasmus zu finden, im Jahr 2011 eingestellt (Meyers & Connolly 2011; Macdonald et al., 2011). Dennoch eröffneten sich nach CONSCIOUS-2 neue Perspektiven und Ansätze in Bezug auf die aSAB Forschung, da Pathomechanismen der DCI von nun an als multifaktoriell betrachtet wurden. Der zerebrale Vasospasmus war von nun an nicht mehr als alleinige Ursache von Bedeutung.

Die aSAB Forschung fokussierte sich nun auf die Entstehung der EBI und der frühen globalen Hirnischämie, wobei die Bildung von Thromben auf mikrovaskulärer Ebene, BHS-Zusammenbruch und inflammatorische Prozesse untersucht werden (Topkoru et al. 2017).

1.3 Das Endothel und seine Eigenschaften

Das Endothel besteht aus einem dichten Endothelzellverband und umgibt das innere Lumen, die sogenannte Intima, aller Blut- und Lymphgefäße. Als Barriere zwischen Blut und Interstitium kontrolliert das Endothel die Migration von Molekülen in das Gewebe sämtlicher Organe und produziert vasoaktive Substanzen, wodurch Gefäßweite und Blutfluss reguliert werden (Dejana et al., 1995). Die immunmodulatorische Funktion des Endothels steuert die Migration von Immunzellen in das Parenchym von Organen, wobei die endothelialen Eigenschaften von Organ zu Organ variieren und zwischen kontinuierlichem und diskontinuierlichem Endothel unterschieden wird. Das kontinuierliche Endothel besteht aus einer dichten Verbindung zwischen den einzelnen Endothelzellen, den Occludenskontakten (engl. *Tight Junctions*, TJs). Kontinuierliche Endothelzellverbände sind in Kapillargefäßen in der Lunge, aber auch im Fettgewebe und in der Haut zu finden. In Organen wie der Leber, der Niere oder dem Knochenmark befindet sich ein diskontinuierliches Endothel, welches sich durch einen lockeren Endothelzellverband auszeichnet. Der Aufbau des jeweiligen Endothels wirkt sich auf die Permeabilität und folglich auf die Funktion des entsprechenden Organs aus (Ince et al., 2016). Die Gefäße des zentralen Nervensystems (ZNS) beherbergen das dichteste Endothel des gesamten Organismus, welches zusammen mit weiteren Zelltypen die BHS bildet (O’Brown et al., 2018).

1.3.1 Definition und Eigenschaften der Bluthirnschranke

Zerebrale Endothelzellen bilden das zelluläre Grundgerüst der BHS (Daneman et al., 2015). Die BHS ist eine hochkomplexe Struktur, welche in ihrer einzigartigen Zusammensetzung ausschließlich in den Gefäßen des Gehirnes zu finden ist, welche aus dem dichtesten Endothel aller Organe bestehen (O’Brown et al., 2018, Daneman et al., 2015). Das Gefäßsystem des ZNS ist deswegen besonders, da es den Transport von Molekülen aus dem Blut in das Gehirnparenchym streng reguliert, wie beispielsweise die Zufuhr von Nährstoffen und die Entfernung von Fremdstoffen und Abfallprodukten, um ein optimales Milieu für die Funktionalität des Nervengewebes zu

gewährleisten. Niedermolekulare lipophile Substanzen sowie Sauerstoff und Kohlendioxid können jedoch entlang des Konzentrationsgradienten durch die Plasmamembran diffundieren. Der Transport von Molekülen aus und in das ZNS muss genauestens reguliert werden, um die streng kontrollierte chemische Zusammensetzung im neuronalen Gewebe aufrechtzuerhalten, welche für eine ordnungsgemäße Funktion essentiell ist (Sweeney et al., 2019). Endothelzellen sind für die Bildung von TJs und Adhärenskontakten (engl. *Adherens Junctions*, AJs) verantwortlich und beschränken den parazellulären Transport von Wasser, Ionen und anderen Molekülen. Die BHS reguliert ihre eigene Permeabilität über Perizyten, welche mit ihren länglichen Fortsätzen die Endothelzellen von abluminal umschließen (Abb 2). Endothelzellen und Perizyten werden jeweils von der Basallamina umhüllt und bilden zusammen mit den Endfüßen der Astrozyten die sogenannte neurovaskuläre Einheit (Iadecola, 2017). Diverse neurodegenerative Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, können zu einer Funktionsstörung der BHS führen, wobei eine Änderungen der BHS-Permeabilität und die Infiltration von schädlichen Blutbestandteilen in das ZNS im Zusammenhang mit einer Fehlregulierung des zerebralen Blutflusses und gestörter *Clearance* stehen (Sweeney et al., 2019). Die genauen Mechanismen, die die BHS-Permeabilität regulieren, sind jedoch nur teilweise bekannt, und es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die regulatorische Funktion der BHS zu verstehen (Daneman et al., 2015).

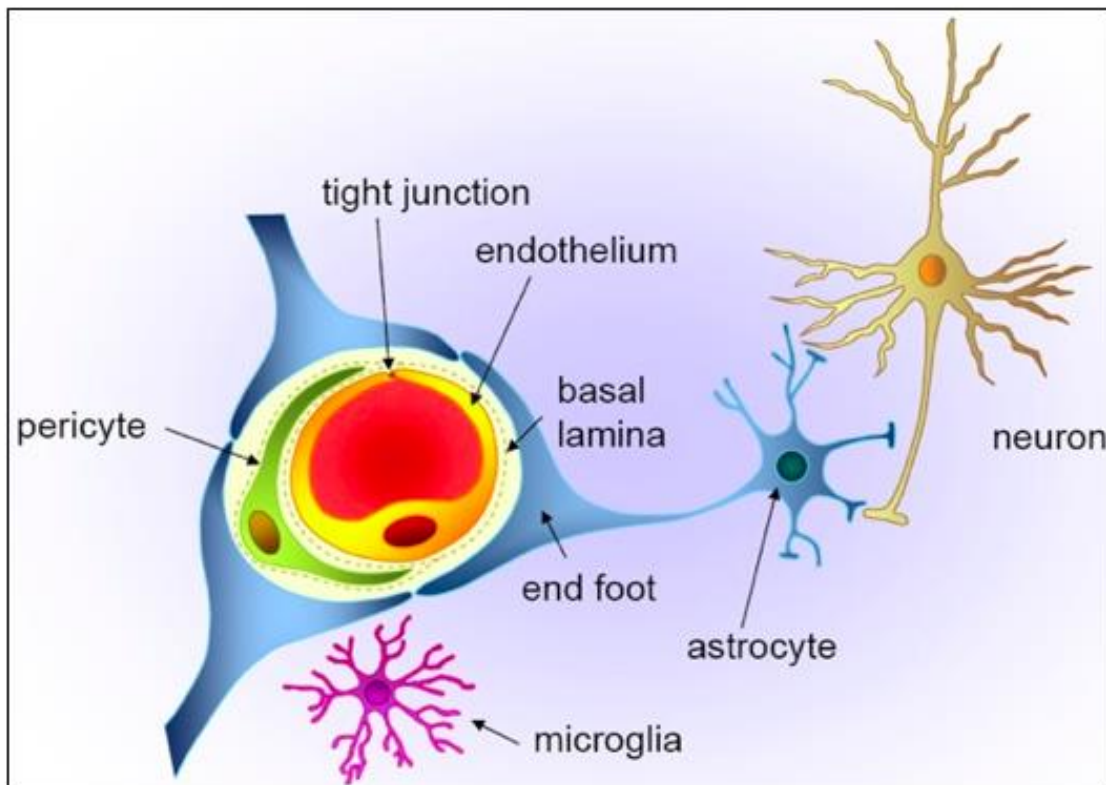


Abb. 2: Die neurovaskuläre Einheit und ihre zellulären Komponenten. Perizyten ummanteln die Endothelzellen, welche über TJs und AJs verbunden sind und den parazellulären Transport regulieren. Die Endfüße der Astrozyten umschließen die Basallamina, welche Endothel und Perizyten umgibt. Mikroglia sind als ZNS-spezifische Immunzellen in unmittelbarer Nähe zur neurovaskulären Einheit lokalisiert (Abbott et al., 2010).

1.3.2 Occludenskontakte (*Tight Junctions*, TJs)

Die TJs sind in erster Linie für einen limitierten parazellulären Transport von hydrophilen Substanzen, Ionen und gelösten Substanzen innerhalb der BHS zuständig. TJs sind als integrale Proteine entscheidend für die Aufrechterhaltung des hohen transendothelialen Widerstandes (engl. *Trans-Endothelial Electrical Resistance*, TEER), welcher bei 1500 bis 2000 $\Omega \times \text{cm}^2$ liegt (Greene et al., 2019; (Hawkins & Davis, 2005). Occludin und Claudin werden zu den wichtigen Vertretern der BHS gezählt und tragen entscheidend zu einer engen Verbindung innerhalb der biologischen Barriere bei (Kiptoo et al., 2016).

Die Claudine gehören zu den TJs und besteht aus 24 verschiedenen Subtypen und bestehen aus 4 Transmembrandomänen in Form einer schleifenähnlichen Struktur bei einer Größe von 20 bis 27 kDa (Anderson et al., 2009; Piontek et al., 2008).

Verschiedene Claudine kommen an unterschiedlichen Stellen im gesamten Körper vor. Davon konnten Claudin-5, -3, und -12 in der BHS nachgewiesen werden, wobei Claudin-5 (Cld5) auf mRNA-Ebene verglichen mit den anderen Claudinen 600-fach höher im Gehirn exprimiert wird. Cld5 wird innerhalb von Epithelzellen als sogenanntes Versiegelungsprotein beschrieben, welches entscheidend zu einem parazellulären Verschluss beiträgt (Amasheh et al., 2005). Die Dysfunktion oder gar der Knockout von Cld5 in der Hirnendothel konnte mit mehreren neurodegenerativen und psychiatrischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Krankheitssymptome sind somit möglicherweise durch die Regulierung der Cld5-Expression zu beeinflussen (Greene et al., 2019). Eine weitere Gruppe konnte an Cld5-Knockout Mäusen weder Blutungen noch Ödemen beobachten. Tracer-Experimente und MRT-Daten ergaben jedoch, dass bei diesen Mäusen die BHS für kleine Moleküle (<800 D) gröÙenselektiv durchlässig war. Cld5 wird somit als ein mögliches Ziel für die Entwicklung neuer Medikamente in Bezug auf ZNS-Erkrankungen gesehen (Nitta et al., 2003).

Occludin ist ein integrales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von ~ 60 kDa und besteht aus vier helikalen membranständigen Domänen, wobei zwei weitere Domänen extrazellulär gelegen sind und jede der Schleifen Aminosäurereste enthält. Ocld ist essenziell für die Stabilisierung zwischen TJs, in dem es die Funktionalität der BHS durch die Erhöhung des TEER gewährleistet (Cummins, 2012). Die Modulation von Ocld ermöglicht eine Erhöhung der Permeabilität der BHS, wodurch essenzielle Moleküle passieren können. Ocld-Knockout Mäuse hingegen zeigen eine gestörte Barrierefunktion, welche sich durch chronische Entzündungen, einen erhöhten parazellulären Transport und einer erschwerten kortikalen Aktinformation, bei sonst intakter TJ-Morphologie, äußert (Cummins, 2012).

Zerebrale Endothelzellen sind bei Verlust der TJs nicht mehr in der Lage, ein festes interzelluläres Gerüst aufrechtzuerhalten, wodurch eine erhöhte BHS-Permeabilität die Homöostase im Gehirn stört. Dieser Zusammenhang konnte in Zellkulturen und anhand von Aufnahmen am Elektronenmikroskop bestätigt werden (Bamforth et al., 1999; Zlokovic, 2008).

1.3.3 Adhärenskontakte (*Adherens Junctions, AJs*)

AJs sind eine Voraussetzung für den Aufbau von TJs, die es Epithelzellen ermöglichen, die Polarität mit verschiedenen Proteinen und Lipiden in den apikalen und basalen Plasmamembranen herzustellen (Collinet et al., 2013). AJs sind charakteristisch für ihre Robustheit und Plastizität. In mehrzelligen Organismen unterstützen sie sowohl eine starke Zell-Zell-Adhäsion als auch eine schnelle Wiederherstellung des Zell-Zell-Kontakts während der Entwicklung und der Wundheilung. Die Kernkomponenten von AJs sind Cadherinmoleküle, die die Zell-Zell-Adhäsion durch homophile Wechselwirkungen vermitteln. Wechselwirkungen zwischen Cadherinen und dem Aktin-Zytoskelett sind wesentlich für die Stabilität und Plastizität von adhärennten Verbindungen. Cadherine regulieren den Umsatz von Aktin, indem sie die Polymerisation steuern und die Aktinmyosin-Netzwerke im Zellkortex verankern. Aktin reguliert wiederum den Cadherinumsatz, indem es seine Endozytose reguliert, und die Umstrukturierung von Zell-Zell-Kontakten antreibt. Das Zusammenspiel zwischen adhärennten Übergängen und kontraktile Aktinmyosin-Netzwerken ermöglicht eine integrierte Dynamik und führt zu unterschiedlichen morphogenetischen Formen von Gewebe und Organen. AJs bestehen aus Cadherinen, eine Gruppe von Transmembranproteinen, die mit anderen Cadherinmolekülen auf benachbarten Zellen, in Abhängigkeit von Kalzium, Homodimere bilden. Das vaskuläre endotheliale Cadherin (engl. *Vascular Endothelial Cadherin, VEC*) gilt als eines der wichtigsten Cadherine (Dejana et al., 2008). Ein weiteres Element der AJs ist das p120 Protein, welches an die Juxtamembranregion des Cadherins bindet. Weitere Proteine wie α -Catenin und γ -Catenin binden an die Catenin-Bindungsregion von Cadherin, wobei α -Catenin Cadherin indirekt über β -Catenin bindet und eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellt (Rubin & Staddon, 1999). Zusätzlich bildet das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül-1 (engl. *Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, PECAM-1*), bekannt auch als CD31 (engl. *Cluster of Differentiation 31*) eine homophile Verbindung zwischen den Endothelzellen und zählt ebenfalls zu den AJs (Iovino et al., 2014).

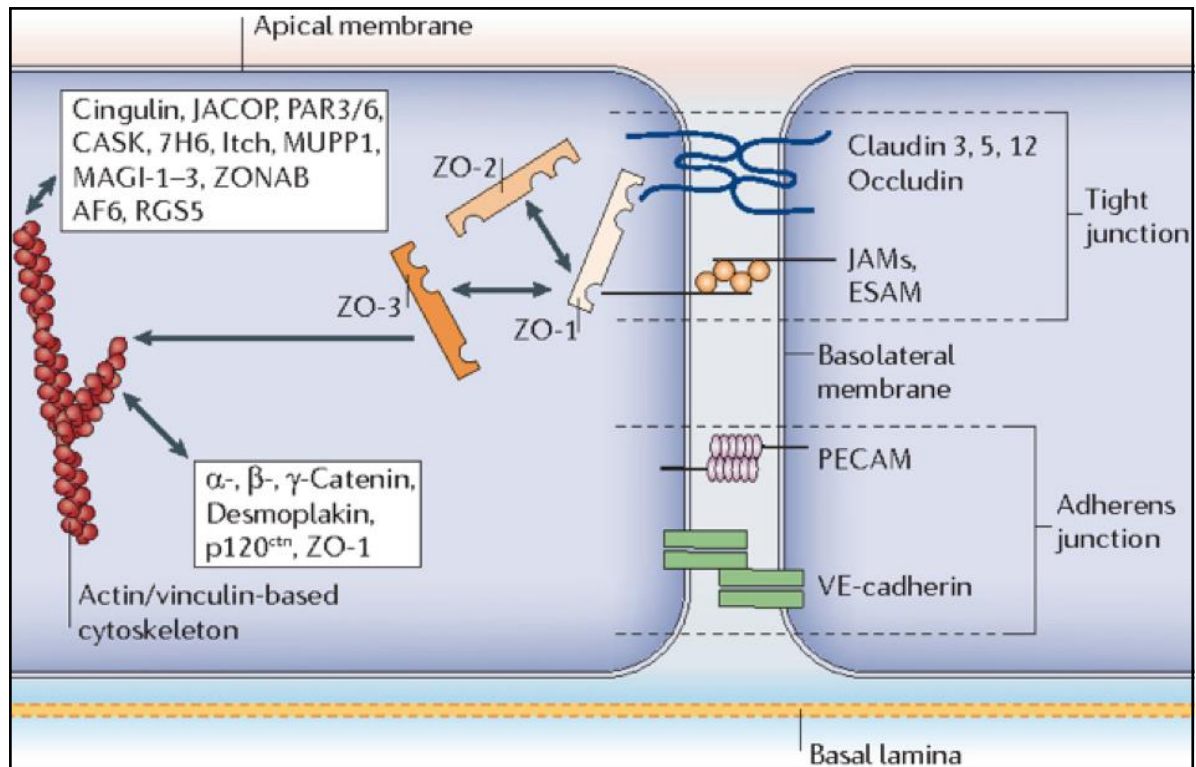


Abb. 3: Endotheliale Adhärens- und Occludenskontakte zwischen zwei Endothelzellen. Vereinfachte Darstellung der Adhärens- und Occludenskontakte, welche die Endothelbarriere ausbilden. Claudin-3, -5, -12 und Occludin sind über ZO-1-3 verbunden, welche über Cingulin an das Aktin-Zytoskelett gebunden werden. VEC wird intrazellulär über Adaptermoleküle wie α -, β - und γ -Catenin, p120 Catenin und weitere Strukturen am Aktin-Zytoskelett gekoppelt. Zusätzlich agiert PECAM-1 als homophiler Adhärenskontakt zwischen den Endothelzellen (Abbott et al., 2006).

1.4 Essenzielle Zytokine und Neuroinflammation

Der Begriff Zytokine beschreibt über 300 verschiedene Polypeptide, wozu unter anderem die Chemokine, Interferone, Wachstumsfaktoren und Interleukine zählen. Zytokine haben komplexe Funktionen und stehen untereinander in Verbindung, wodurch sie sich in ihrer jeweiligen Funktion beeinflussen. Zytokine regulieren Entzündungen, Zellsignale und verschiedene Zellprozesse wie Wachstum und Überleben von Zellen (Ramesh et al., 2013; Vilček et al., 2003). Sie können die Proliferation eines bestimmten Zelltyps stimulieren, wobei bei einer anderen Zelle ein Wachstumsstopp oder gar eine Apoptose verursacht werden kann. Zudem ist bekannt, dass Zytokine an Entzündungsprozessen, Immunreaktionen, Zelldifferenzierungen und Apoptosen beteiligt sind. Chemokine sind eine Untergruppe von Zytokinen, die die Zellmigration regulieren und die Opsonierung von Immunzellen anregen. Die Neuroinflammation ist eine Entzündung des Nervengewebes und eine Reaktion auf Infektionen, traumatische Hirnverletzungen, toxische Metabolite oder Autoimmunität

(Gendelman et al., 2002). Die gehirneigenen Immunzellen werden auch Mikroglia genannt und können zusammen mit Astrozyten, Endothelzellen und anderen Gliazellen, Zytokine produzieren und ausschütten. Unter physiologischen Umständen werden Zytokine freigesetzt und rufen eine lokal begrenzte Entzündung aus, wodurch Mikroglia rekrutiert werden und die Entzündung beseitigen.

Das ZNS nimmt eine Sonderstellung in Bezug auf inflammatorische Prozesse ein, da periphere Immunzellen unter physiologischen Bedingungen durch die BHS blockiert werden (Das Sarma et al., 2014). Bei der neuronalen Inflammation führt eine verzögerte Freisetzung von Zytokinen zu einer verlängerten Entzündung, wodurch eine Schädigung der BHS entsteht. Periphere Immunzellen werden dann über die Zytokinfreisetzung an den Ort der Entzündung gerufen und können durch die beeinträchtigte BHS wandern, wobei das Aufeinandertreffen mit Neuronen und Gliazellen im ZNS eine Immunantwort auslöst und aufrechterhält (T'Hart et al., 2013; Nilupul et al., 2006). Obwohl die Reaktion eingeleitet wird, um das ZNS vor einer weiteren Schädigung zu schützen, kann die Wirkung toxisch sein und weitreichende Entzündungen sowie eine verstärkte Leukozytenmigration durch die BHS verursachen (Gendelman et al., 2002). Zytokine, die typischerweise als Reaktion auf eine Hirnverletzung produziert werden und eine neuronale Zytotoxizität verursachen, sind Interleukin-1 β (IL1 β), Tumornekrosfaktor- α (TNF α) und IL6 (Ramesh et al., 2013). Trotz Apoptose und sekundären Gewebeschaden, sind diese Zytokine jedoch essenziell, um zerstörtes neuronales Gewebe zu reparieren.

Das ZNS reagiert auf eine Dysbalance der Zytokin-Interaktion sensibel und ist daher Gegenstand der Forschung auf dem Gebiet der neurodegenerativen und inflammatorischen ZNS-Erkrankungen (De Chiara et al., 2012). Der immunologische Hintergrund der Zytokine im peripheren Blutkreislauf wurde bereits im Detail erforscht. In Bezug auf ZNS-Erkrankungen ist die Rolle der Zytokine und dessen Pathomechanismen jedoch weiterhin nicht ausreichend verstanden (Becher et al., 2017).

1.4.1 IL1 β und TNF α im ZNS

IL1 β und TNF α werden durch Immunzellen wie Leukozyten und Makrophagen als auch im ZNS durch Mikrogliazellen, Astrozyten, Neuronen und Endothelzellen exprimiert und freigesetzt. Die Freisetzung ist abhängig von proinflammatorischen Stimuli, wie der Präsenz von mikrobiotischen oder viralen Proteinen, der Aktivierung

weiterer Zytokine oder Apoptosen. Beide Moleküle haben vielfältige Funktionen und sind außerdem an Zell-Proliferation und Migration beteiligt (Touzani et al., 1999; Saito et al., 1996).

TNF α ist ein Mitglied der TNF-Superfamilie, bestehend aus verschiedenen Transmembranproteinen und einer homologen TNF-Domäne. Es wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen produziert, obwohl es auch von CD4+ Lymphozyten, Neutrophilen und Neuronen ausgeschüttet werden kann. Die Hauptaufgabe von TNF α ist die Regulierung von Immunzellen und als endogenes Pyrogen kann es Fieber, Apoptose, Kachexie und Entzündungen auslösen, als auch die Tumorentstehung und die Virusreplikation hemmen. Eine Dysregulation von TNF α konnte in einer Vielzahl von Erkrankungen beobachtet werden, darunter neurodegenerative Erkrankungen, Krebs und viele weitere Pathologien (Locksley et al., 2001).

Im ZNS spielt TNF α eine physiologische Rolle bei der Steuerung der synaptischen Übertragung und Plastizität im gesunden ZNS durch Modulation des ionotropen Glutamatrezeptors. Aufgrund von ZNS-Verletzungen, wie Schädel-Hirn Trauma oder Schlaganfall, wirkt ein erhöhter TNF α -Spiegel hemmend auf den Glutamattransporter, gefolgt von einer erhöhten und somit neurotoxischen Glutamatkonzentration (Olmos et al., 2014). TNF α ist außerdem ein entzündungsförderndes Zytokin, das sowohl eine homöostatische als auch eine pathophysiologische Rolle im ZNS einnimmt. Unter pathologischen Bedingungen setzen Mikroglia große Mengen von TNF α frei, was mit mehreren neurologischen Störungen verbunden ist. TNF α besitzt außerdem die Fähigkeit, die Neurogenese zu stimulieren und gleichzeitig zu hemmen. In-vitro-Studien haben gezeigt, dass TNF α die Differenzierungsphase der Neurogenese beeinflusst und die Entwicklung von Neuronen reduziert, während es die Entwicklung von Astrozyten stimuliert (Hendriksen et al., 2017). Am ischämischen Schlaganfallmodell an der Maus konnte eine protektive Rolle von TNF α nachgewiesen werden, wobei die Neurogenese nach dem Schlaganfall in der Maus begünstigt war. TNF α scheint je nach Kondition eine protektive als auch eine destruktive Rolle im ZNS einzunehmen, wobei dies von diversen Faktoren abhängig ist (Hendriksen et al., 2017; Heldmann et al., 2005).

IL1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, das für die Abwehrreaktionen gegen Infektionen und Verletzungen von entscheidender Bedeutung ist. Als am besten am untersuchtes Molekül der 11 verschiedenen IL1-Zytokine, wird es von einer Vielzahl von Zelltypen produziert und ausgeschüttet, jedoch insbesondere von Monozyten und

Makrophagen (Lopez-Castejon et al., 2011). Auch aufgrund seiner vielfältigen Funktionen, ist IL1 β im ZNS ein Hauptmediator in entzündlichen Prozessen. Es wird vermehrt unter pathologischen Umständen wie bei einem Schädel-Hirn-Trauma, bei neurodegenerativen Prozessen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, Multipler Sklerose und dem Down-Syndrom exprimiert (Allan & Rothwell, 2001). Nach akuter Hirnischämie begünstigt IL1 β die Apoptose von Neuronen, wodurch die Degeneration von Nervengewebe in Gang gesetzt wird. In experimentellen Studien konnte eine Erhöhung von IL1 β mit neuronaler Apoptose in Verbindung gebracht werden. Schlaganfall-Studien an der Maus zeigten erhöhte IL1 β -Werte bereits in den ersten drei Stunden nach Ischämie, was konstant über mehrere Tage messbar war. Die Hauptquelle von IL1 β konnte initial in Mikrogliazellen detektiert werden, wobei spätere Zeitpunkte eine erhöhte Expression in Astrozyten zeigte (Davies et al., 1999; Hillhouse et al., 1998; Giulian et al., 1986). Darüber hinaus interagieren sowohl IL1 β als auch TNF α mit weiteren Zytokinen, wodurch ihre Funktion im jeweiligen Kontext sehr variabel erscheint und dessen Pathomechanismen noch nicht ausreichend verstanden ist (Becher et al., 2017).

1.4.2 Transsignalweg des IL6-Rezeptors und die Expression im ZNS

IL6 ist ein pleiotropes Zytokin und besteht aus vier helikalen Bündeln, welches im ZNS von Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen sowohl unter physiologischen und als auch unter pathologischen Bedingungen sezerniert wird (Erta et al., 2012; Jüttler et al., 2003). Es ist bekannt für die Beteiligung an der Kaskade der Akutphase und der Immunantwort über die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten. Der IL6-Signalweg agiert über zwei dimerbildende Rezeptoren, welche die biologische Aktivität von IL6 vermitteln. Eine der IL6-bindenden Untereinheiten ist der IL6-Rezeptor (IL6R), der auch als Glykoprotein (GP) 80 bekannt ist und als membrangebundene und als lösliche Form (engl. *soluble Interleukin-6 receptor*, sIL6R) vorliegt. Während IL6R die Rezeptorkomplexuntereinheit darstellt, die hauptsächlich an der Erkennung des Liganden beteiligt ist, repräsentiert die andere Untereinheit des Dimers, das GP130, den signaltransduzierenden Empfängerteil, der bei IL6 /IL6R-Stimulation über die Janus Kinasen (JAKs) phosphoryliert wird. Die Dimerisierung von IL6R und GP130 ist nach Bindung des IL6-Liganden essenziell für die intrazelluläre Aktivierung des JAK-Signal-*Transducers*, gefolgt von der Transkription über den JAK-STAT-Signalweg (Abb 4) (Heinrich et al., 2003). Während GP130 auf allen Zellen exprimiert wird, ist

IL6R nur in wenigen Zellen vorhanden und nachgewiesen. Zellen, die IL6R nicht exprimieren, können nicht über den klassischen Signalweg den IL6 Liganden binden, da GP130 alleine keine Affinität für IL6 aufweist. Interessanterweise kann der sIL6R, der den extrazellulären Teil des Rezeptors umfasst, IL6 mit einer ähnlichen Affinität wie das membrangebundene IL6R binden. Der Komplex von IL6 und sIL6R kann in Zellen, die IL6R nicht exprimieren und sonst nicht auf IL6 ansprechen, an GP130 binden. Dieser Vorgang wird als Transsignalweg beschrieben (Rose-John, 2012). Der membranständige IL6R in Endothelzellen wurde lange kontrovers diskutiert und erst kürzlich durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen worden (Blecharz-Lang et al., 2018).

Unter physiologischen Umständen zeigt sich IL6 protektiv gegenüber Neuronen und spielt eine entscheidende Rolle bei der Proliferation von neuronalen Stammzellen (Bowen et al., 2011). Im Rahmen von inflammatorischen Prozessen ist IL6 jedoch neurotoxisch und bewirkt eine Hemmung der Neurogenese von hippocampalen Neuronen in in-vitro-Versuchen (Monje et al., 2003; Vallières et al., 2002). Im gesunden Gehirn ist die Expression von IL6 unter physiologischen Bedingungen extrem gering und kaum zu detektieren. Unter inflammatorischen Umständen zeigt sich jedoch ein dramatischer Anstieg von IL6 (Jüttler et al., 2003).

Unsere Arbeitsgruppe konnte sowohl In vivo als auch In vitro die Präsenz beider Rezeptoruntereinheiten im BHS-Endothel nachweisen und die endotheleigene Expression des IL6R bestätigen (Blecharz-Lang et al., 2018).

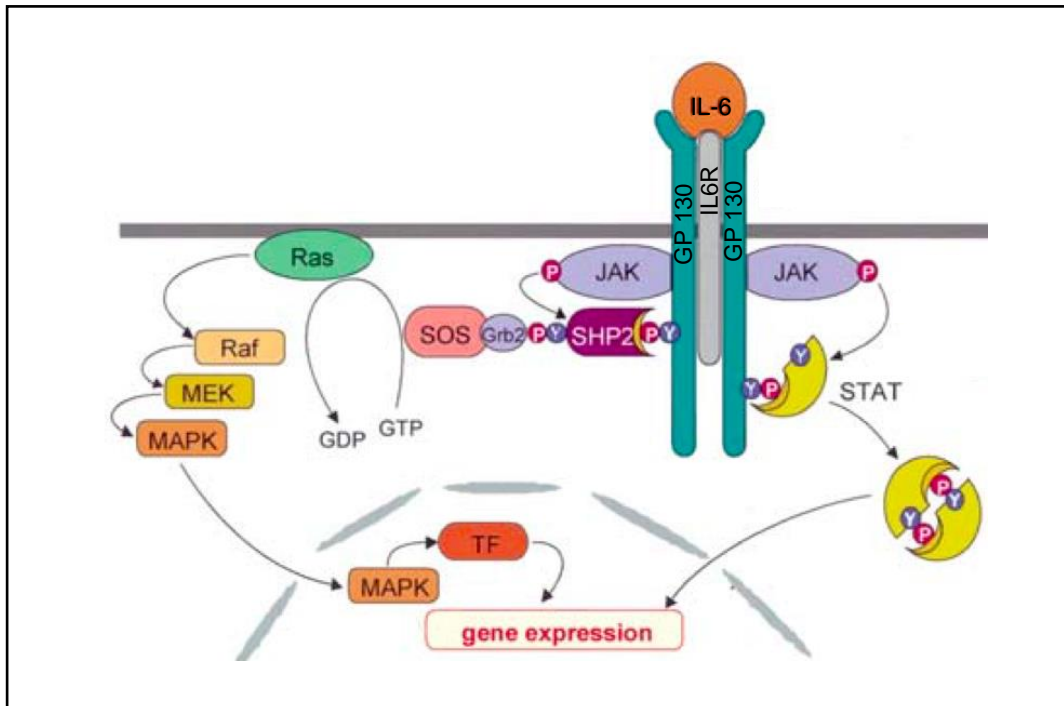


Abb. 4: Der IL6 Ligand aktiviert den JAK/STAT Signalweg und die MAPK-Kaskade über die Dimerisierung von IL6R und GP 130 (modifiziert nach Heinrich et al., 2003).

1.5 Neuroinflammation und BHS-Schädigung unter Einfluss von IL6

Klinische Studien offenbarten erhöhte IL6-Konzentrationen im Liquor von Patienten nach aSAB, was auf schwere inflammatorische Prozesse und einem BHS-Zusammenbruch im ZNS zurückzuführen war. Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation zum Schweregrad des Krankheitsverlaufs, wobei IL6 als prognostischer Marker für den klinischen Verlauf diente (A. Sarrafzadeh et al., 2010; Graetz et al., 2009). Mittels Mikrodialyse können IL6-Werte in extrazellulärer Gehirnflüssigkeit, im Liquor und im Plasma von aSAB-Patienten untersucht werden, wobei ein erhöhtes IL6 nur im Liquor und in extrazellulärer Gehirnflüssigkeit mit einer ungünstigen Prognose in Verbindung stand. Erhöhte IL6-Werte im Plasma allein zeigten keinen Einfluss auf die Prognose, was zu der Annahme führte, dass erhöhte IL6-Werte nach aSAB sich nicht systemisch, sondern ausschließlich auf das Gehirn negativ ausübten und mit EBI in Verbindung gebracht werden konnte (A. Sarrafzadeh et al., 2010). Experimentell konnte unsere Arbeitsgruppe bereits in vorherigen Publikationen eine erhöhte Expression von IL6 nach aSAB, ausgehend von Mikroglia, in der Maus nachweisen. Unter der Verwendung von Knochenmark-Chimären-Mäusen konnten alle peripheren Immunzellen, die GFP (*engl. Green Fluorescent Protein, GFP*) positiv waren, verfolgt und untersucht werden.

Eine intrazerebrale Anhäufung von Entzündungszellen wurde zwischen dem 4. und 28. Tag nach eSAB detektiert. Somit wurde eine echte ZNS-intrinsische Aktivierung von Mikroglia, die einen entzündlichen Zustand durch eine erhöhte IL6-Expression aufzeigten, bestätigt. Die Invasion von myeloiden Zellen aus der Peripherie in das Gehirn konnte ausgeschlossen werden. Darüber hinaus zeigte sich im Verlauf nach eSAB eine sekundäre neuro-axonale Schädigung, bei parallel zeitgleichem Verlauf zwischen einem neuronalen Zelltod und der Akkumulation von Mikroglia. Unter Verwendung von CD11b-HSVTK transgenen Mäusen, welche durch eine Herpes simplex Thymidinkinase eine zellspezifische Ablation verschiedener Zellen über die Applikation von Ganciclovir ermöglichen, konnten in dieser Studie Mikroglia gezielt deaktiviert werden. Das Ausmaß des neuronalen Zelltods war nach Erschöpfung der Mikroglia signifikant verringert, mit der Schlussfolgerung, dass die Akkumulation von Mikroglia eine sekundäre Hirnverletzung nach eSAB durch eine intraparenchymale proinflammatorische Aktivierung von $TNF\alpha$, $IL1\beta$ und IL6 und seiner Rezeptoren verursacht (Schneider et al., 2015).

Ein BHS-Zusammenbruch steht mit zerebrovaskulären Erkrankungen wie dem Schlaganfall, Gehirntumoren, multipler Sklerose und aSAB in Verbindung und ist demzufolge ein wichtiger Bestandteil der Forschung (Coisne E et al., 2011).

Die Migration von Immunzellen in das Gehirnparenchym, wie die Extravasation von Leukozyten aus dem Blut, ist unter physiologischen Bedingungen streng limitiert. Die Bildung von Autoantikörpern, oxidativer Stress oder eine erhöhte Ausschüttung von Zytokinen verursachen den Untergang von TJs und AJs (de Wit et al., 2016). Der unkontrollierte Einstrom von Immunzellen und anderen Molekülen führt zu einem gestörten Gleichgewicht und zu einer neuronalen Dysfunktion, gefolgt von Neuroinflammation und Degeneration des Nervengewebes. Wie bereits erwähnt zeigten klinische Studien anhand von bildgebenden Verfahren die Entstehung eines Hirnödems bereits vierundzwanzig Stunden nach aSAB, wobei ein BHS-Zusammenbruch diagnostiziert wurde, was zu einer Verschlechterung der Prognose bei aSAB-Patienten führte. Die molekularen Zusammenhänge zwischen des BHS-Zusammenbruchs und der Rolle von neuroinflammatorischen Prozessen im Rahmen der aSAB sind jedoch bis heute nicht ausreichend geklärt (Obermeier et al., 2013; Edvinsson & Povlsen, 2011; László et al., 1995). Neuroinflammatorische Prozesse triggern die Ausschüttung essenzieller Zytokine, welche die BHS-Permeabilität erhöhen (Abbott et al., 2012).

Hierbei führt vermutlich die zelluläre Interaktion zwischen Endothel und der Adhäsion peripherer Immunzellen zu einer Degradation der Extrazellulärmatrix über Proteasen wie die Matrixmetalloprotease-9 (MMP9), gefolgt von einem Verlust der TJs und AJs (Atangana et al., 2016; Coisne & Engelhardt, 2011). Eine Hypothese beschreibt die Einwanderung von Immunzellen über die BHS einige Tage nach aSAB, welche die Blutkoagel infiltrieren und abbauen. Dieser Abbauprozess führt parallel zu einer überschießenden Zytokinfreisetzung (Pradilla et al., 2010). Unter pathologischen Umständen synthetisieren, nebst Mikroglia auch Endothelzellen Zytokine wie $TNF\alpha$, $IL1\beta$, und $IL6$ in erhöhter Konzentration (Coisne & Engelhardt, 2011; Jüttler et al., 2003). Zerebrale Endothelzellen werden zusätzlich von umliegenden Zellen des ZNS, von Liquor und vom Plasma stimuliert, gefolgt von erhöhter Zytokinfreisetzung und der Aktivierung von Signalkaskaden (Kimura et al., 2003; Abbott, 2000).

In den vergangenen Jahrzehnten wurde die BHS mehrfach unter dem Gesichtspunkt der EBI nach aSAB in klinischen und experimentellen Studien untersucht. Zudem wird die Rolle der BHS nach aSAB kontrovers diskutiert. Hierbei stellt sich die Frage, ob der Zusammenbruch eine positive Funktion in Bezug auf Heilungsprozesse im Gehirn einnimmt oder ob der Untergang der BHS ein fatales Ausmaß durch die Apoptose von Nervengewebe zur Folge hat (Macdonald, 2014).

Andererseits zeigte die Studie um Atangana et al., dass trotz eines BHS-Zusammenbruchs keine Leukozytenmigration in das Gehirn nach eSAB zu beobachten war, jedoch trotzdem eine intrazerebrale Inflammation stattfindet. Hierbei wird von einem *outside-in*-Effekt oder von einer extrazerebralen intravaskulären Inflammation gesprochen, welche das zerebrale Immunsystem, speziell die Mikroglia, von außen durch intravaskuläre Leukozyten aktiviert. Hierbei könnte $IL6$ als essenzieller Mediator der Neuroinflammation, eine *Messenger*-Funktion zwischen Gehirndothel, luminaler BHS-Aktivierung über Leukozyten, und dem Gehirnparenchym fungieren (Atangana et al., 2016; Schneider et al., 2015).

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Zusammenhang zwischen IL6-vermittelter Inflammation auf endothelialer Ebene und einen BHS-Zusammenbruch nach eSAB zu untersuchen. Zunächst sollte unter der Anwendung des Fadenperforationsmodells an der Maus analysiert werden, ob ein BHS-Zusammenbruch nachweisbar ist und welche Zeitpunkte nach eSAB von Interesse für die weitere Studie sind. Dieser Schritt erfolgte über die intravenöse Injektion des fluoreszenten Tracers Evans blue mit anschließender photometrischer Messung von Gehirnhomogenaten, gefolgt von immunhistochemischen Analysen. Die Bestimmung der Gen- und Proteinexpression konzentrierte sich auf die TJs Moleküle Cld5 und Ocld, welche essenziell für die BHS-Integrität sind. Als zweiter Schritt stand die Untersuchung der Zytokinexpression nach eSAB im Vordergrund. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte durch die Isolierung von Kapillargewebe von Mausgehirnen nach eSAB, wobei eine Überexpression von IL6, TNF α und IL1 β nachgewiesen wurde. Schließlich wurde die Auswirkung von rekombinantem IL6-Protein (rIL6) am In vitro BHS-Modell der zerebralen Endothelzelllinie cEND, untersucht.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit eine zeitliche Korrelation zwischen der Inflammation ausgehend von IL6 und einem BHS-Zusammenbruch nach eSAB In vivo. Zudem überexprimieren isolierte Gehirnkapillaren endothelzellspezifische IL6-Vesikel nach eSAB im zeitlichen Verlauf. In vitro führte die rIL6-Behandlung der cEND-Zelllinie zu einem BHS-Untergang. Die hiermit untersuchten Pathomechanismen dienen dazu, die Entstehung der EBI im Rahmen der aSAB besser verstehen zu können, wodurch die Grundlage für einen zukünftigen therapeutischen Ansatz geschaffen werden soll.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Reagenzien, Chemikalien, Puffer

Tabelle 1: Zusätze und Chemikalien

Substanz	Hersteller
BSA	Sigma-Aldrich
DAPI	Sigma-Aldrich
Casein	Sigma-Aldrich
Fetal Calv Serum (FCS)	PAA Laboratories
PBS; pH 7,4	Gibco®
Natriumchlorid	Merck Millipore
Hank Salt Solution (HBSS+) ohne und mit Ca ²⁺ ; mit Mg ²⁺	Biochrom
Evans blue (2 %)	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Agarose	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck Millipore
Formaldehyd	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Triton-X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Isopropanol	R&D Systems

Tabelle 2: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Ethidiumbromidlösung 0,5mg/ml	Promega
HyperladderTM II	Bioline
QuantiTec® Reverse Transcription Kit	Qiagen
Ambion® RNA Kit	Invitrogen
Premix ex Taq Perfect Real Time Kit	Takara
Streptavidin Horseradish Peroxidase	Amersham
N-Methyl dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich
Trizol®	Roth

Tabelle 3: Puffer und Medien

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
BSA/PBS 0,5 %; pH 7.4	5 g bovine serum albumin (BSA)/1l PBS	PAA Laboratories
Casein 1 %	1 g Casein/100 ml PBS	Sigma-Aldrich
Casein 0,5 %	0,5 g Casein/100 ml	Sigma-Aldrich
DMEM	DMEM (High Glucose, LGlutamin,- Pyruvat,- Phenolrot) + 100 U/ml Penicillin + 100 g/ml Streptomycin + 10 % FCS + 50 µM 2-Mercaptoethanol	Lonza PAA Laboratories PAA Laboratories Gibco® Invitrogen

Paraformaldehyd 2 %	20 g Paraformaldehyd/1 l PBS	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd 4 %	40 g Paraformaldehyd/1 l PBS	Sigma-Aldrich
Saponin 0,5 %	5 g Saponin/1 l PBS/BSA	Sigma-Aldrich
Triton 0,3 %	300 µl Triton-X-100/100 ml PBS	Sigma-Aldrich

2.1.2 Antikörper

Tabelle 4. Primär- und Sekundärantikörper für Immunhistochemie

Epitop- Fluorochrom	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
<i>Primärantikörper</i>			
CD31	Ratte	1:100	R&D Systems
Cld5	Maus	1:100	LifeTechnologies
Ocl4	Maus	1:100	LifeTechnologies
<i>Sekundärantikörper</i>			
DyLight 488	Hase	1:200	JacksonLab
CY3	Ratte	1:200	Abcam

2.1.3 Primer für quantitative *real-time* RT-PCR

Tabelle 5: Primer

Spezifität		Sequenz	Hersteller
Cld5	forward	5'-GTGGAACGCTCAGATTTTCAT-3'	TIB Molbiol
	reverse	5'-TGGACATTAAGGCAGCATCT-3'	
OclD	forward	5'-ATCCTGGGCATCATGGTGTTT-3'	
	reverse	5'-GGGCCGTCGGGTTCACT-3'	
IL6	forward	5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3'	
	reverse	5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'	
IL1 β	forward	5'-ATCACTCATTGTGGCTGTGG-3'	
	reverse	5'-CATCTCGGAGCCTGTAGTGC-3	
TNF α	forward	5'-CACAGCCTTCCTCACAGAGC-3'	
	reverse	5'-GGAGGCAACAAGGTAGAGAGG-3'	

2.2. Tierexperimentelles Arbeiten

2.2.1 Umgang und Pflege der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden durch die hauseigene Tierpflege (Aschheim-Zondek Haus, Charité Berlin) regelmäßig versorgt und in Polycarbonat-Käfigen gehalten. Hierbei wurde die Anzahl von sechs Tieren pro Käfig nicht überschritten. Futter und Trinkwasser waren für die Tiere innerhalb des Käfigs frei zugänglich und in ihrer Menge unbeschränkt. Die Versuchstiere waren aufgrund des kontinuierlichen zwölf Stunden Hell-/Dunkelzyklus einem regelmäßigen Biorhythmus im Tierstall ausgesetzt. Trinkwasserflaschen und Käfige wurden autoklaviert, wobei Wasser und Futter davon ausgeschlossen wurden. Alle neu gelieferten Tiere wurden für mindestens fünf Tage zur Anpassung an die neue Umgebung in ihrem Käfig belassen, bevor die ersten Experimente durchgeführt wurden. Während des experimentellen Zeitraumes standen die Tiere vom Versuchsleiter unter täglicher Beobachtung. Hierbei wurde sich auf das Verhalten, die Bewegung der Tiere sowie ihre körperliche Konstitution (Gewicht, Fell und Sauberkeit) konzentriert. Konnte während der Experimente ein Gewichtsverlust von über 20 % oder eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes festgestellt werden, wurden die Versuchstiere euthanasiert. Diese Rahmenbedingungen wurde innerhalb des Tierversuchsantrages festgehalten und unter der Nummer G0240/08 von der Tierschutzkommission der Landesregierung Berlin bewilligt.

2.2.2 Stamm und Eigenschaften der Versuchstiere

Die durchgeführten Experimente wurden an C57BL/6J Mäusen durchgeführt. Dabei wurden weibliche Tiere mit einem mittleren Alter von acht bis zwölf Wochen und einem Gewicht von 20 g bis 25 g verwendet. Die Tiere wurden aus der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin Charité-Universitätsmedizin Berlin bezogen.

2.2.3 Fadenperforationsmethode zur Induktion einer eSAB

Die Versuchstiere wurden durch eine Injektionsanästhesie in das Peritoneum mit 66 mg/kg Ketavet® (50 mg/ml Ketaminbase) und 3,3 mg/kg Rompun® (20 mg/ml Xylazine-Hydrochlorid) in Narkose versetzt. Nach Einsetzen der Wirkung, was in der Regel in zehn bis 15 Minuten eintrat, konnte mit der Operationsvorbereitung begonnen werden. Die Tiefe der Anästhesie wurde durch die Überprüfung des Zwischenzehenreflexes und des Whisker-Reflexes geprüft.

Bei Vorhandensein der Reflexe wurde weiterhin abgewartet und nach wenigen Minuten erneut geprüft. Da ein Austrocknen der Augen während der Anästhesie schnell eintritt, wurde zum Schutz bei jeder Operation Bepanthen® Salbe (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) auf beide Augen appliziert. Unter Abwesenheit der geprüften Reflexe konnte das Versuchstier in Rückenlage auf einer Wärmeplattform platziert werden. Es erfolgte die anschließende Fixierung der Extremitäten und die Extension des Nackens. Zuvor wurde der Operationsbereich ausreichend desinfiziert und abgedeckt. Der erste Präparationsschritt erfolgte oberhalb des Jugulums über einen Mittellinienschnitt. Nach erfolgreicher Präparation unter dem Operationsmikroskop (Zeiss, Deisenhofen, Deutschland) zeigte sich die anatomische Darstellung der A. carotis communis, der A. carotis interna und der A. carotis externa. Nach Abschluss der Gefäßstamm-Präparation konnte nun die A. carotis externa ligiert und durchtrennt werden. Durch die 90 Grad Rotation des ligierten Gefäßstumpfes wurde ein Zugang zur A. carotis interna hergestellt. Um den Blutfluss für den Arterienschnitt und die Einführung des Fadens kurzzeitig zu unterbinden, erfolgte die Applikation zweier Mikroclips, jeweils ein Clip auf die A. carotis communis und ein Clip um die A. carotis interna. Es folgte ein kleiner Einschnitt in den Stumpf der A. carotis externa mit zügigem Einführen des Polyethylen-Fadens (stumpfe Spitze, monofiles Nahtmaterial Stärke 5-0). Der fadentragende Stumpf wurde mit einer lockeren Ligatur versehen, wodurch eine sichere Position und gleichzeitig eine Beweglichkeit des Fadens gewährleistet wurde. Nach Anbringen der Ligaturen wurden die Mikroclips zügig entfernt, um das Versuchstier nur kurzzeitig einem verminderten zerebralen Blutfluss auszusetzen. Um eine 100 %ige Reoxygenierung des Gehirnes zu gewährleisten, wurde für einige Sekunden keine Manipulation an den Gefäßen vorgenommen. Anschließend erfolgte das retrograde Verschieben des Fadens in die A. carotis interna. Die Passage durch die Schädelbasis ist nach 5 mm bis 6 mm Fadenlänge erreicht. Bei weiterem Verschieben auf 8 mm bis 9 mm trifft der Faden auf die Bifurkation der A. carotis interna und der A. cerebri media und perforiert die Gefäßwand. Nach erfolgreich induzierter eSAB kann eine charakteristische Atemveränderung beobachtet werden. Dieser sogenannte Cushing-Reflex zeigt einen Atemstillstand für wenige Sekunden mit anschließender Wiederaufnahme der Atmung. Normalisiert sich die Atmung nicht in Frequenz und Tiefe nach ungefähr einer Minute, ist in der Regel mit dem baldigen Sterben des Tieres zu rechnen.

Nach erfolgreicher Induktion musste der Faden aus den Gefäßen vollständig entfernt werden und die locker sitzende Ligatur konnte nun vollständig angezogen werden, um die Eintrittspforte zu verschließen. Abschließend wurde die Halswunde durch eine feste Einzelknopfnaht verschlossen. Postoperativ wurde das narkotisierte Versuchstier auf eine dafür vorgesehene Wärmeplattform (Medax, Deutschland) appliziert, um eine Hypothermie zu vermeiden und um das Aufwachen aus der Narkose zu beschleunigen. Das Tier wurde dabei kontinuierlich durch den Versuchsleiter beobachtet, bis es das volle Bewusstsein wiedererlangte. Wacht das Tier nach spätestens einer halben Stunde nicht wieder auf, so muss es aufgrund der Schwere der eSAB euthanasiert werden. Postoperativ wurde eine Analgesie durch Paracetamol im Trinkwasser des Versuchstieres gewährleistet. Auf eine Antibiose wurde aufgrund der antiinflammatorischen Effekte verzichtet.

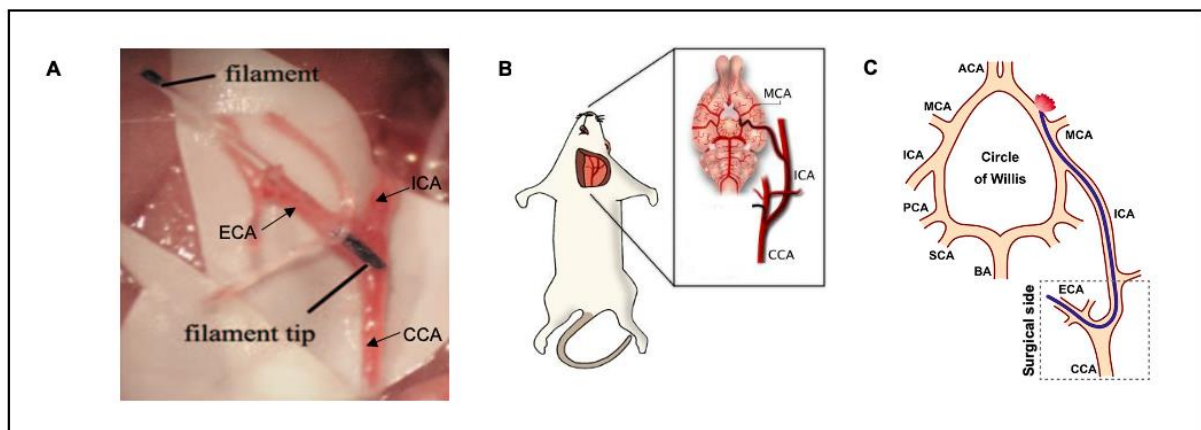


Abb. 5: Fadenperforationsmethode zur Induktion der eSAB an der Maus. A) Überblick über das Operationsgebiet mit Darstellung der Aa. carotis interna (*internal carotid artery*, ICA), externa (*external carotid artery*, ECA) und communis (*common carotid artery*, CCA). Die rechte ECA wurde über eine Mittellinieninzision entlang der Trachea frei präpariert und anschließend ligiert. Ein 5-0 Polyethylen-Faden (Filament) wurde durch den Stumpf eingeführt und in Richtung rechte ICA geschoben (modifiziert nach Muroi et al., 2014). B) Fixierte Position der Maus während der OP mit Überstreckung des Nackens. C) Schematische Darstellung der Perforationsmethode auf Höhe der Bifurkation der A. cerebri media (*middle cerebral artery*, MCA) und anterior (*anterior cerebral artery*, ACA) (Bühler et al., 2014).

2.2.4 Intrakardiale Perfusion

Um eine makellose Entnahme der perfundierten Gehirne durchzuführen, wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis Ketavet®/Rompun® zunächst narkotisiert. Nach vollständigem Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes erfolgte die Eröffnung der

Bauch- und dann der Brusthöhle. Über einen Rippenbogenschnitt wurde ein Zugang zum Herz, der abdominalen Aorta und der Vena cava geschaffen. Um einen venösen Ausstrom zu ermöglichen, wurde der rechte Vorhof leicht inzidiert. Anschließend erfolgte das Einführen einer Kanüle (\varnothing 26–27 mm) in den linken Ventrikel des Herzens, welche mit einer PBS-gefüllten Spritze konnektiert wurde. Es konnte nun die Perfusion unter konstanter Geschwindigkeit und konstantem Druck vorsichtig durchgeführt werden. Mit Hilfe einer anatomischen Pinzette erfolgte die Entnahme der Gehirne über die vorsichtige Eröffnung der Schädelkalotte. Die Gehirne wurden sofort mit flüssigem Stickstoff kryokonserviert und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Anfertigen von Gefrierschnitten am Kryostat

Die Gehirne wurden erst unmittelbar vor dem Schneiden am Kryostat aus ihrem Lager bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ entnommen. Um ein Auftauen der Gehirne zu verhindern, wurden diese sofort in das Kryostat platziert. Es folgte die Einbettung des Gewebes mit 1 %iger Fischgelatine und anschließender Äquilibration des Kryostates auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Schnittdicke wurde auf $7,5\text{ }\mu\text{m}$ eingestellt. Die Schnitte wurden aus zwei verschiedenen Ebenen des Gehirnes entnommen:

(Bregma; Leitstruktur: Commissura anterior, Corpus callosum)

- . E1 Bregma $-0,6$ bis $-1,0$ mm; Leitstruktur: Thalamus, Hypothalamus
- . E3 Bregma $-2,1$ bis $-2,5$ mm; Leitstruktur: Hippocampus

Die Schnitte wurden mittels „Menzel Superfrost plus“-Objektträger aufgenommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

2.3.2 Fixierung und Vorbereitung der Gefrierschnitte

Die chemische Fixierung der Gehirne erfolgte erst unmittelbar vor der Weiterverarbeitung. Hierfür wurden die Schnitte aus ihrem Lager von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ entnommen und auf Raumtemperatur aufgetaut. Nach dem Auftauen und Trocknen erfolgte die Umrandung der Gehirne mit einem Fettstift (Dako-Pen). Zunächst fand ein Fixierungsschritt in eiskaltem Methanol auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für zehn Minuten statt.

Im Anschluss an einen Waschschrift mit PBS für fünf Minuten erfolgte nun eine 30-minütige Inkubation mit einem Blockierungspuffer, welcher sich aus 1 %igem Casein in PBS zusammensetzte. Alle Schritte wurden bis auf die Fixierung bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

2.3.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung beschreibt das Prinzip eines fluoreszierenden Farbstoffes, welcher an einen Antikörper gebunden ist und eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit der Zielstruktur eingeht. Dabei entsteht eine fluoreszierende Verbindung, welche unter Belichtung eine definierte Wellenlänge abgibt. Durch die Immunfluoreszenzmikroskopie wird die definierte Wellenlänge sichtbar gemacht.

Sämtliche extra- und intrazelluläre Strukturen können somit dargestellt und untersucht werden. Nach dem Blockierungsschritt mit 1 %igem Casein/PBS folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper für 24 Stunden bei 4 °C. Anschließend wurden drei Waschschriffe mit 0,5 %igem Casein/PBS zu je fünf Minuten durchgeführt, um überschüssige Antikörper zu eliminieren. Der nächste Schritt bestand aus der Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1,5 Stunden bei RT. Es folgten drei weitere Waschschriffe mit PBS und ein letzter Waschschrift mit Wasser. Nach einem leichten Prozess der Trocknung wurden die Schnitte mit DAPI-Eindeckmedium benetzt und mit Deckgläschen vorsichtig versiegelt. Die Lagerung der Präparate erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C in dafür vorgesehenen Pappen bis zur weiteren Analyse am Fluoreszenzmikroskop.

2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Gefrierschnitte wurden zur Darstellung der Morphologie von Gehirngewebe mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung verarbeitet. Der erste Schritt diente der kurzen Fixierung mit 100 %igem Ethanol und anschließender Hämalaun-Behandlung für drei Minuten. Im Anschluss fand das Anheben des pH-Wertes und das Bläuen der Strukturen unter Leitungswasser für zwei bis fünf Minuten statt, gefolgt von einmal Eintauchen in Eosin-Lösung für 15 Sekunden. Nach einer weiteren kurzen Inkubation mit Leitungswasser für 15 Sekunden wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert.

- a) 70 % Ethanol für 20 Sekunden
- b) 80 % Ethanol für ein bis zwei Minuten
- c) 96 % Ethanol für ein bis zwei Minuten
- d) 100 % Ethanol für ein bis zwei Minuten

Die Klärung der Gewebeschnitte wurde durch eine Inkubation mit dem anorganischen Lösungsmittel Xylol für eine Minute erreicht. Abschließend konnten die Schnitte mit Deckgläsern eingedeckelt und versiegelt werden.

2.3.5 Herstellen von Gehirn-Homogenaten

Zunächst wurde eine 2 %ige Lösung mit dem Farbstoff Evans blue auf 1 ml gelöst in Natriumchlorid vorbereitet und bis zum Gebrauch in dunkler Umgebung gelagert. Das Versuchstier wurde zunächst mittels Injektionsanästhesie in das Peritoneum mit 66 mg/kg Ketavet® und 3,3 mg/kg Rompun® anästhesiert. Nach Verlust des Zwischenzehenreflexes wurde über die Zungenvene die fertige Lösung intravenös verabreicht. Die Konzentration beruhte auf 0,1 ml auf 10 g Körpergewicht, 5 UE/ 10 g entsprechend. Bei erfolgreicher Injektion ist eine Blaufärbung des Versuchstiers sofort zu beobachten. Anschließend zirkulierte Evans blue für zwei Stunden im wachen Versuchstier, welches unter kontinuierlicher Beobachtung stand. Es folgte die Euthanasie und Perfusion, gemäß dem bereits beschriebenen Prozedere. Nach der intrakardialen Perfusion wurden die Tiere dekapiert und die Gehirne entnommen, welche auf einer Petrischale in zwei Hemisphären geteilt wurden. Die Aufbewahrung der Gewebeproben erfolgte jeweils in einem 15 ml Röhrchen mit 400 µl N-Methyl dimethylformamid (DMF)-Lösung. Das Gewicht des Gehirnes wurde anschließend gewogen und das Leergewicht des Röhrchens subtrahiert. Die Proben wurden mit einem Gewebehomogenisator für 45 Sekunden wiederholt homogenisiert. Nach der Zentrifugierung bei 3000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C konnte der Überstand abpipettiert werden, gefolgt von einem neuen Zentrifugierungsschritt bei 21 000 G für 30 Minuten bei 4 °C. Im Anschluss wurde jeweils zu 100 µl pro Well in Duplikaten eine 96 Well-Platte mit dem gewonnenen Überstand pipettiert. Parallel erfolgte zusätzlich das Pipettieren einer Standardverdünnungsreihe mit Evans blue zu unterschiedlichen Konzentrationen. Die Messung der Fluoreszenz konnte nun bei einer Wellenlänge von 620 nm am Absorptionschromatographen (Infinite® 200 PRO Tecan, Männedorf,

Schweiz) erfolgen. Die Resultate des Chromatographen werden in *represent relative fluorescence units* (RFU) angegeben. Die RFU-Werte wurden abschließend pro Gramm Gehirngewicht berechnet.

2.3.6 Isolierung und Immunhistochemie von Gehirnkapillaren

Material

- 2 x kleine Pinzetten
- 2 x kleine Scheren
- 1 x große Pinzette zur Euthanasie
- 2 x Petri-Schalen
- Dulbecco's modified eagles medium (DMEM) mit Glukose (4,5 g/ml)
- Dounce Gewebehomogenisierer (7 ml) inklusive Zerstoßer
- Dextran Puder, Mw ~70 kDa
- 40 µm Nylonnetz-Filter (2,5 cm Durchmesser)
- Filterhalter
- 10 ml Nadel
- 15 ml und 50 ml *falcon tubes*

Dieser Teil der Arbeit erfolgte in Kollaboration mit Dr. rer. nat. Lars Winkler, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie Berlin, anhand einer bereits publizierten Methode der AG um Ingolf Blasig (Del Vecchio et al., 2012). Kurz zusammengefasst wurden die Gehirne vom olfaktorischen Bulbus, dem Zerebellum und den Meningen getrennt und zwei ipsilaterale Hemisphären miteinander gepoolt und homogenisiert in DMEM (4.5 g/L Glukose). Gleiche Volumina von jeweils 32 % Dextran wurden hinzugefügt (60 bis 70 kDa, Sigma-Aldrich) und anschließend zentrifugiert für 15 Minuten bei 4500×g und 4 °C. Nach Entfernung des Myelins wurde das Pellet in DMEM resuspendiert und durch ein Nylonnetz gefiltert (40 µm, Millipore). Die gewonnenen Kapillaren wurden herunterzentrifugiert für das finale Pellet, welches sofort in Lyse-Puffer gelöst wurde (RNeasy Mini Plus Kit, Qiagen, Hilden, Germany) für die anschließende RNA-Extraktion. Für die Weiterverarbeitung mittels Immunhistochemie erfolgte keine Lyse. Die immunhistochemische Färbung der Kapillaren wurde durch Dr. Winkler im Leibniz-Institut durchgeführt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA Extraktion von In-vivo-Gewebe

Mithilfe des Trizol[®] RNA Extraktions Kit (Roth[®]) wurde die RNA nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert und bei - 80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Um die Reinheit der RNA zu berechnen, musste die Absorptionsbestimmung innerhalb des Spektrums zwischen 260 nm und 280 nm gewählt werden (Bereich 1,8 bis 2,0). Als erster Arbeitsschritt erfolgte die Homogenisierung in 750 µl Trizol pro 50 mg bis 100 mg Gewebe. Das Homogenat wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und fünf Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. In einem nächsten Schritt erfolgte die Phasenseparation, wobei dem Gewebehomogenat 200 µl Chloroform pro 750 µl Probenmenge beigemischt und die Lösung 15 Sekunden lang gevortext wurde. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm (Zentrifuge: Eppendorf Zentrifuge 5415C) war eine deutliche Auftrennung der Lösung in drei Phasen erkennbar. Die obere wässrige Phase enthielt die zu isolierende RNA. Diese wurde sorgfältig von der mittleren (Protein-haltigen) und der unteren (DNA-haltigen) Phase abgenommen, und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende RNA-Präzipitation erfolgte durch Hinzugabe von 100 % Isopropanol (500 µl pro 750 µl Trizol-Gewebereagenz) und mehrmaligem Invertieren des Eppendorf-Reaktionsgefäßes, gefolgt von zehnmütiger Zentrifugation bei 13000 rpm auf RT. Es bildete sich ein weißer Niederschlag, wonach das Isopropanol entfernt werden konnte. Die letzte Phase beinhaltete das Reinigen und das Lösen des Trizol-Reagenz, was nach zweifachem Waschen des Niederschlags mit 100 % Ethanol erfolgte. Eine letzte Zentrifugation bei 13000 rpm auf RT für fünf Minuten ermöglichte es, das Pellet im Reaktionsgefäß liegend auf RT trocknen zu lassen und in einem letzten Schritt in RNase-freiem Wasser zu resuspendieren.

2.4.2 Herstellen von cDNA über reverse Transkription

Die Umschreibung von mRNA in cDNA ist für die anschließende quantitative *real-time* PCR notwendig. Dieser Arbeitsschritt erfolgte unter dem Einsatz der reversen Transkription mittels des QuantiTec[®] *reverse Transcription kit* (Qiagen). Die Arbeitsschritte wurden laut Angabe des Herstellers durchgeführt und beinhalteten die Eliminierung der genomischen DNA, sowie die Umschreibung der RNA in cDNA über die reverse Transkription. Um noch vorhandene genomische DNA zu entfernen, wurde in einem ersten Schritt die extrahierte RNA (12 µl) zusammen mit 2 µl gDNA *Wipeout*

Buffer für zwei Minuten bei 42 °C in einem iCycler (Bio-Rad, München) inkubiert. Die Durchführung der reversen Transkription erfolgte anschließend in einem *Thermocycler* (Biometra). Für diesen Schritt wurden 1 µl *quantiscript reverse transcriptase*, 4 µl *quantiscript RT buffer* und 1 µl *RT primer mix* hinzugegeben, worauf die Inkubation im Thermocycler bei 42 °C (Amplifikation) für 30 Minuten und bei 95 °C (Denaturierung) für fünf Minuten stattfinden konnte. Nach Inkubation wurde die Reaktionstemperatur auf 4 °C gesenkt, mit anschließender Lagerung der cDNA bei - 20 °C.

2.4.3 Semiquantitative real time qRT-PCR

Die semiquantitative *realtime* qRT-PCR dient der Quantifizierung von Nukleinsäuren und basiert auf dem Prinzip der PCR, mit dem Unterschied, dass die Anzahl der Kopien mit Hilfe von Fluoreszenzsignalen in Echtzeit gemessen wird. Hierfür wurde der *Premix ex Taq Perfect Real Time Kit* (Takara) benutzt und alle Arbeitsschritte laut dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Für den qPCR-Amplifikationsschritt wurden Mausgen-spezifische Primer (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH) verwendet. Das Gesamtreaktionsvolumen des Mastermixes betrug 20 µl und pro Reaktion wurde 5 µl cDNA (25ng/µl) eingesetzt. Alle Proben wurden in Triplikaten pipettiert. Für eine semiquantitative Expressionsanalyse kam neben den spezifischen Primern zusätzlich für jede Probe eine interne Kontrolle mit dem *housekeeping* Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zum Einsatz. Der durchschnittliche CT-Wert (Schwellenzyklus) wurde durch den Computer über das ABI PRISM 7300 SDS Programm ermittelt. Die Berechnung der Genexpression basierte auf der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode und erfolgte über die Expressionsbestimmung des Zielgens mit der Differenz (ΔCT) zwischen den durchschnittlichen CT-Werten der Proben und denen der internen Kontrolle. Daraufhin wurde für jedes Genprodukt die Differenz ($\Delta\Delta CT$) zwischen den durchschnittlichen ΔCT -Werten der Proben und den entsprechenden ΔCT -Werten der Kontrollen errechnet.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{Probe}) - \Delta CT (\text{Kontrolle})$$

Der relative Quantifizierungswert (RQ), welcher als $2^{-\Delta\Delta CT}$ ausgedrückt wird, erlaubt dann eine Analyse der Expressionsverhältnisse der Genprodukte. Die Spezifität der qPCR-Produkte wurde anhand von Analysen der Schmelzkurven bestimmt.

2.5 Zellkulturmethoden

2.5.1 Kultivierung der immortalisierten Hirnendothelzelllinie cEND

Tabelle 6: Zelllinie und Kulturbedingungen

Name	Herkunft	Medium	FCS	Zusätze
cEND	Mikrovaskuläre zerebrale Endothelzelllinie, murin (Förster et al., 2005)	DMEM (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	10% (inaktiviert) 1% (bereinigt von Hormonen) bei Differenzierung	Penizillin + Streptomycin 200 mM L-Glutamin 100x (PAA-Laboratories, Berlin) 100 mM Na-Pyruvat (Biochrom AG, Berlin) NEAA 100x (Biochrom AG) MEM-Vitamine 100x (Biochrom AG)

2.5.1.1 Kultivierung und Aussaat

Die zerebrale mikrovaskuläre Endothelzelllinie cEND wurde mit dem Maus-spezifischen Polyoma MiddleT Virus immortalisiert und konnte bis zu 20 Passagen ohne Veränderung ihrer Eigenschaften kultiviert werden (Förster et al., 2005). Die Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS-Anteil und Zusätzen (siehe Tab. 7) in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und einem 5 % CO₂-Anteil in wassergesättigter Atmosphäre (etwa 90 % Wasserfeuchtigkeit) aufbewahrt. Für ein experimentelles Vorgehen wurden die Zellen jeweils bis zu einer 80 %igen Konfluenz kultiviert.

2.5.1.2 Mediumwechsel

Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage unter sterilen Bedingungen und unter der Abzugshaube (Heraeus®). Hierzu wurde der Mediumüberstand von den Zellen mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und durch frisches, auf 37 °C erwärmtes Medium ersetzt.

2.5.1.3 Beschichtung der Kulturgefäße

Kollagen IV Beschichtung

Die Kulturgefäße wurden mit einer Kollagen IV-Beschichtung (Stocklösung: 50 µl/ ml in 50 mM Essigsäure) benetzt und eine Stunde lang auf RT inkubiert. Die überschüssige Lösung wurde anschließend komplett abgesogen und alle Gefäße drei Mal mit PBS gewaschen. Die Zellkulturen konnten so in die Gefäße überführt werden.

Gelatinieren

Das Gelatinieren von Kulturgefäßen erfolgte mit 0,5 % (w/v) Gelatine (Kollagen I) bei einer Inkubation auf RT für zehn Minuten. Die Kulturgefäße wurden für weitere fünf Minuten auf den Rand gestellt, um ein Absinken des Gelatineüberstandes vom Flaschenboden zu ermöglichen. Die Gelatine wurde vollständig abgesogen und die Zellen konnten in die Kulturgefäße überführt werden.

2.5.1.4 Subkultivieren der cEND-Zelllinie

Sobald sich ein konfluenter *Monolayer* der Zellen ausgebildet hatte, erfolgte das Subkultivieren oder *Splitten* der Zellen. Zunächst wurde das Medium unter sterilen Bedingungen abgesogen, gefolgt von einem Waschschrift der Zellen mit PBS und einer kurzen Inkubation mit Trypsin-EDTA Medium. Für ein 1:3-*Splitten* wurde je 3 ml Trypsin pro Kulturflasche (75 cm²-Fläche) verwendet. Sobald sich die Zellen nach wenigen Sekunden lösten, wurde die Wirkung von Trypsin durch die Zugabe von 6 ml Kulturmedium gestoppt. Die gelöste Zellsuspension wurde mittels Pasteurpipette aufgenommen und auf drei neue Kulturgefäße verteilt. Schließlich erfolgte das Auffüllen mit frischem Kulturmedium bis zum entsprechenden Stand.

2.5.1.5 Kryokonservierung

Vor der Kryokonservierung von Zellproben erfolgte das zuvor beschriebene Subkultivieren der Zellen mittels der enzymatischen Wirkung von Trypsin. Die Überführung der Zellen wurde mit reichlich Medium und einem 15 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen sowie anschließendem Zentrifugieren bei 250 g für fünf Minuten durchgeführt. Der Überstand wurde vorsichtig abpipetiert und das verbliebene Sediment mit dem Einfriermedium aufgenommen.

Pro Kulturflasche (75 cm²) wurden je 2 ml Einfriermedium auf jeweils 1 ml, davon auf ein gekühltes Kryoröhrchen (Nunc), portioniert. Dem verwendeten Kulturmedium wurden zusätzlich 20 % FCS und 10 % DMSO hinzugefügt. Die Zellen wurden bei – 80 °C eingefroren und nach drei Tagen für eine Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff (- 196 °C) überführt. Die Qualitätsüberprüfung der eingefrorenen Zellen erfolgte nach einer Woche mittels eines aufgetauten Aliquots.

Einfriermedium:

Das Einfriermedium bestand aus 9 ml Medium, versetzt mit 20 % FCS-Anteil und einem Penizillin-Streptomycin-Zusatz, welches in 1 ml DMSO gelöst wurde.

2.5.1.6 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte mit einer geringen Menge von erwärmtem Medium, wonach das aufgetaute Einfriermedium mit den gefrorenen Zellen in ein 15 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Nach fünfminütiger Zentrifugierung bei 250 g konnte der Überstand abgesaugt werden. Das Zellpellet wurde mittels frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine frische Kulturflasche überführt.

2.6 Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes

Für die Messung des TEER ($\Omega \times \text{cm}^2$) wurden die cEND-Zellen auf einen gelatinierten Transwell-Filtereinsatz (BD) mit sechs Vertiefungen ausgesät. Nach Erreichen einer entsprechenden Zellkonfluenz konnte der TEER mit Hilfe eines Volt-Ohm-Meter (*World Precision Instruments*) gemessen werden. Der Leerwert wurde über einen leeren Filter ohne Zellen bestimmt. Unter Berücksichtigung des Leerwertes wurde der TEER unter Verwendung folgender Formel kalkuliert:

$$\text{TEER} = [\text{Messwert (behandelte Zellen)} - \text{Leerwert}] \times \text{Filterfläche}$$

2.7 Behandlung der cEND-Zellen mit rIL6

Die cEND-Zellen wurden für die Experimente wie zuvor beschrieben kultiviert. Nachdem ein Zell *Monolayer* eine 80 %ige Konfluenz erreicht hatte, konnten die Zellen in ein mit reduziertem DMEM (2 % (v/v)) und mit Dextran überzogenes Serum, zusammen mit Aktivkohle-behandelten FCS transferiert werden. Anschließend wurden die Zellkulturen mit unterschiedlichen rIL6-Konzentrationen (R&D Systems) stimuliert oder als unbehandelt für Kontrollen belassen.

2.8 RNA Extraktion von Zellkulturen mittels Ambion® RNA-Kit

Unter der vorherigen Hinzugabe eines Lysepuffers (12-well 300 µl Lysis-Puffer + β -Mercaptoethanol) wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt. Die Zelllysate konnten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Aufarbeitung wegefroren werden, falls keine sofortige Weiterverarbeitung stattfand. Als nächster Schritt erfolgte die Homogenisierung der Zellen durch fünfmaliges Aufziehen über eine Nadel. Die weiteren Schritte wurden je nach Hersteller-Protokoll weitergeführt. Das Lösen der RNA erfolgte in 2x20 µl RNase-freiem H_2O , mit anschließender Konzentrationsmessung am Absorptionschromatographen (TECAN®).

Statistische Analyse

Statistische Unterschiede wurden unter Verwendung des zweiseitigen *student's T-Tests* (Microsoft Excel™) berechnet. Die Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ (*) festgelegt, wobei $p < 0,01$ (**) als hochsignifikant galt.

3. Ergebnisse

In der Literatur konnten Veränderungen der BHS nach eSAB in Form von Extravasation und vasogenem Hirnödem bereits festgestellt werden. Ein vasogenes Hirnödem wurde auch in Patienten nach aSAB beobachtet, wobei zusätzlich erhöhte Zytokinwerte im Liquor und im Plasma gefunden wurden. Insbesondere eine hohe IL6-Konzentration im Liquor von Patienten stellte sich als prognostisch ungünstiger Faktor heraus. Welche Rollen das BHS-Endothel und eine erhöhte IL6-Konzentration auf die Pathophysiologie der aSAB spielen und welchen Einfluss IL6 auf die BHS-Eigenschaften ausübt, wurde bis heute nicht untersucht.

Die Zielsetzung der Arbeit bestand darin, die Eigenschaften der BHS nach eSAB in der Maus zu charakterisieren und den Zusammenhang zwischen einem BHS-Zusammenbruch und der intravaskulären Inflammation nach eSAB zu bestimmen. Zunächst wurde die Extravasation der BHS im Mausmodell charakterisiert und die Expression der TJs und AJs analysiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Gehirnkapillaren mit der Bestimmung des Zytokinprofils von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ und IL6 auf endothelialer Ebene. Schließlich wurde im letzten Teil der Arbeit der Einfluss von rIL6 auf die BHS In vitro anhand der cEND-Zelllinie untersucht.

3.1 Ausschluss intrazerebraler Blutungen und Verletzungen nach eSAB

3.1.1 Makroskopische Begutachtung

Grundlage der Arbeit war die exakte Induktion einer eSAB unter Anwendung des Fadenperforationsmodells. Um die erfolgreiche Induktion und die Verteilung des subarachnoidalen Blutes zu evaluieren, wurden die Gehirne nach Entnahme begutachtet und fotografisch dokumentiert (Abb. 6). Vorherige Arbeiten zeigen, dass die Resorption der SAB spätestens nach 28 Tagen erfolgt ist (Schneider et al., 2015). Die Blutung sammelt sich in den subarachnoidalen Zisternen der Hirnbasis und entlang der kortikalen Gefäße an (Abb. 6 B, C). Die Herausforderung der Fadenperforationsmethode ist das Auslösen einer eSAB, ohne dabei das Gehirnparenchym durch den Faden zu verletzen und eine ICB auszulösen (Abb. 6 D).

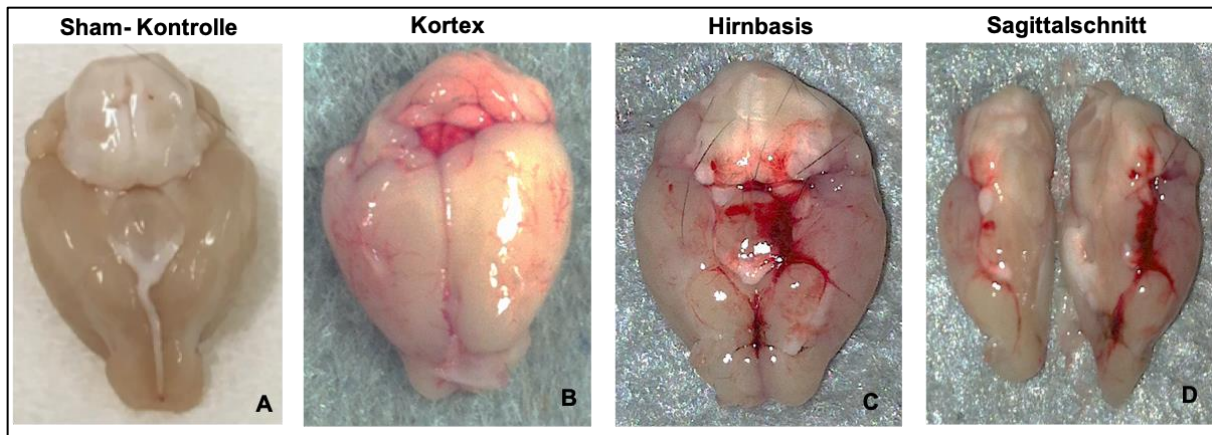


Abb. 6: Makroskopische Blutverteilung unmittelbar nach eSAB Induktion. (A) Hirnbasis eines *sham*-Kontrolltiers ohne Blut. (B) Verteilung von subarachnoidalen Blut entlang der kortikalen Gefäße unmittelbar nach Gefäßperforation. (C) Ventrale Ansicht von (B) mit basaler Blutkolektion. (D) Sagittaler Schnitt von (B, C) zum Ausschluss einer Perforation des Hirnparenchyms. Die Blutansammlung befindet sich ausschließlich im subarachnoidalen Kompartiment.

3.1.2 Histologie mittels HE-Färbung

Um eine Perforation auch auf mikroskopischer Ebene ausschließen zu können, wurden koronare Gehirnschnitte mittels HE-Färbung angefertigt (Abb. 7 A, B). Parenchymale Eisenablagerungen stellen die Verteilung des Blutes dar, wodurch eine intrazerebrale Blutung (ICB) beziehungsweise eine akzidentelle Perforation des Gehirnparenchyms ausgeschlossen werden kann. Aufgrund dieser Vorgehensweise wurde sichergestellt, dass die folgenden Effekte ausschließlich von Prozessen beeinflusst werden, welche ihren Ursprung im Subarachnoidalraum haben. Tiere mit ICB oder Destruktion des Parenchyms wurden aus der Studie ausgeschlossen.

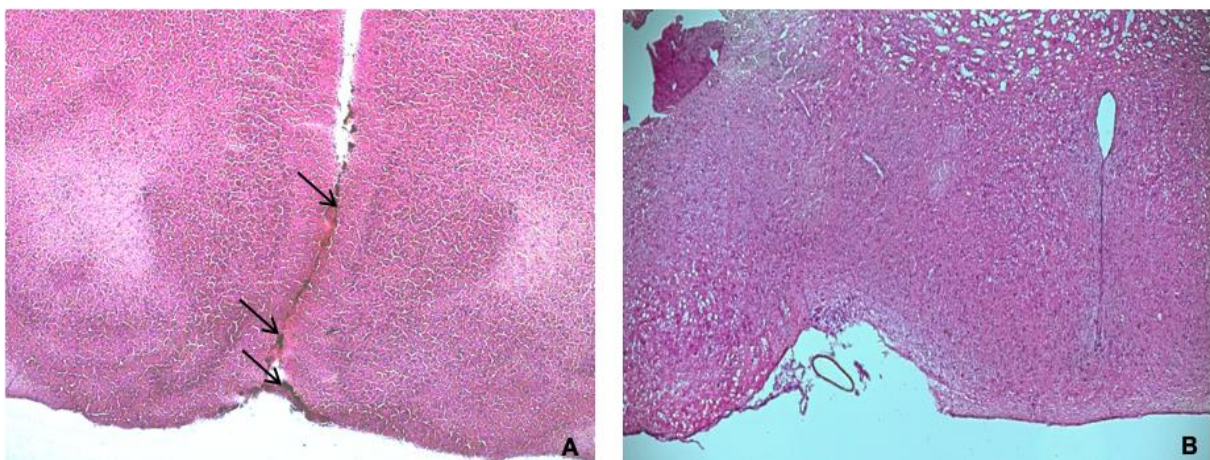


Abb. 7: HE-Färbung als mikroskopischer Nachweis einer erfolgreich induzierten eSAB. (A) Koronarer Schnitt der basalen Gehirnregion auf Höhe des Bregmas nach eSAB. Eisenablagerungen sind ausschließlich entlang des Subarachnoidalraumes zu beobachten (Pfeile). Eine ICB kann somit ausgeschlossen werden. (B) *sham*-Kontrolltier ohne Eisenablagerungen.

3.2 Zusammenbruch der BHS nach eSAB

Nachdem die eSAB erfolgreich induziert werden konnte, widmete sich der nächste Arbeitsschritt den BHS-Eigenschaften nach eSAB. Zunächst wurde die Extravasation von Evans blue immunhistochemisch und quantitativ im zeitlichen Verlauf nach eSAB bestimmt, um einen BHS-Zusammenbruch nachweisen zu können.

3.2.1 Parenchymale Anreicherung von Evans blue

Nachdem Evans blue intravenös verabreicht und die Versuchstiere perfundiert wurden, erfolgte zunächst die makroskopische Begutachtung der Gehirne. Bereits hier war der Austritt des Farbstoffs in der ipsilateralen Gehirnhemisphäre nach eSAB zu sehen (Abb. 8 B). Die *sham*-Kontrolle zeigte hingegen nach Verabreichung von Evans blue keinen Austritt des Farbstoffes in das Parenchym (Abb. 8 A).

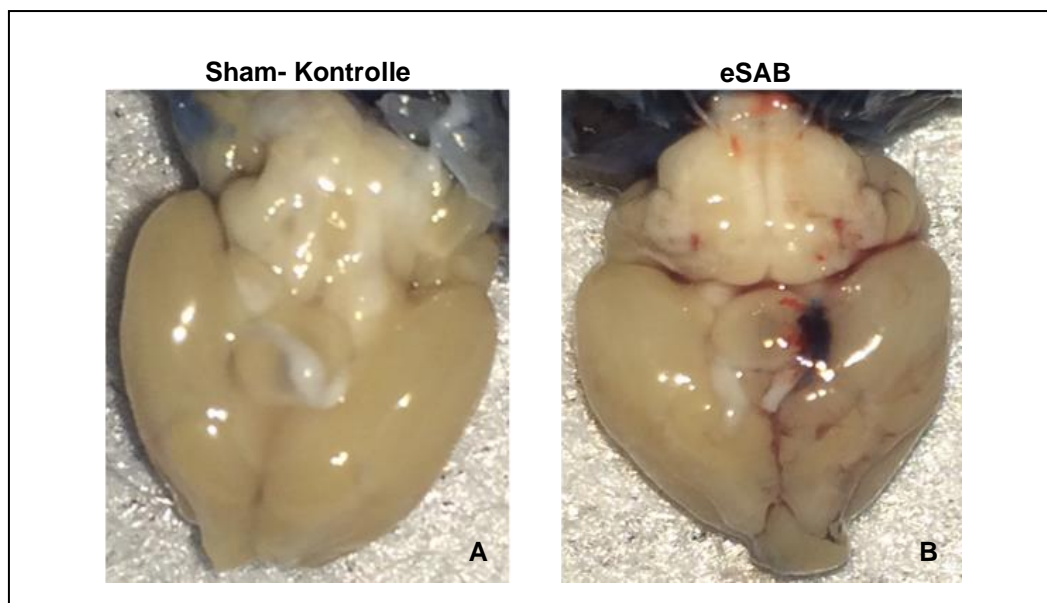


Abb. 8: Makroskopische Darstellung der Extravasation von Evans blue nach eSAB (A) Hirnbasis einer *sham*-Kontrolle nach Evans blue Applikation ohne parenchymale Anreicherung des Farbstoffes. (B) Gehirn nach eSAB und Evans blue Applikation. Die Extravasation des Farbstoffes ist durch die Graufärbung der gesamten ipsilateralen Hemisphäre und innerhalb des Blutkoagels als bläuliche Ansammlung deutlich zu erkennen.

3.2.2 Quantitativer Nachweis der Extravasation von Evans blue

Nach der makroskopischen Beurteilung wurden die Gehirne homogenisiert und die Extravasation von Evans blue quantitativ mittels photometrischer Analyse an den Tagen 2, 4 und 7 nach eSAB bestimmt. Die Daten zeigten einen Anstieg der Extravasation an Tag 2 und 4 nach eSAB. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte jedoch nur an Tag 4 nach eSAB festgestellt werden. Tag 7 zeigte keinen Anstieg der Extravasation.

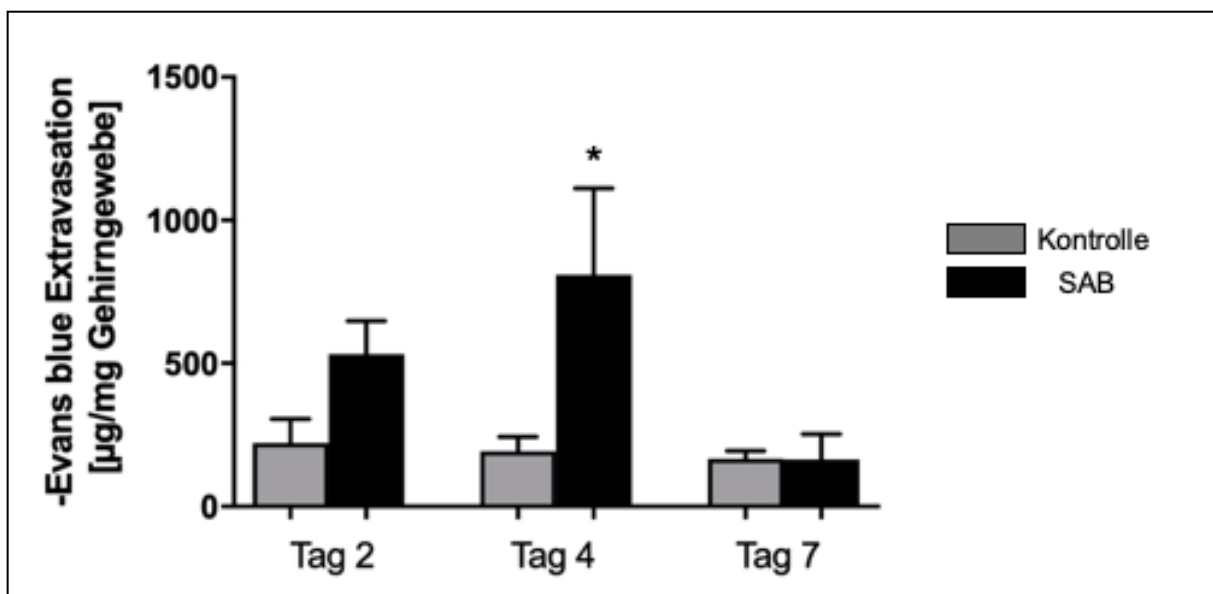


Abb. 9: Quantitativer Nachweis der Extravasation von Evans blue nach eSAB. Die Absorptionsbestimmung zeigte den Verlauf einer deutlichen Extravasation von Evans blue an den Tagen 2 und 4 mit Signifikanz an Tag 4. Alle Datensätze wurden mit der respektiven *sham*-Kontrolle verglichen; $n=6$; (* $p < 0.05$).

3.2.3 Immunhistochemie perivaskulärer Extravasation von Evans blue

Zuletzt galt es, die Extravasation von Evans blue und dessen Verteilung im Hirnparenchym zu visualisieren. Die zuvor erhobenen quantitativen Daten ergaben eine statistische Signifikanz der Evans blue Extravasation an Tag 4 nach eSAB. In der Histologie koronarer Gewebeschnitte konnte eine maximale Signalintensität von Evans blue ebenfalls an Tag 4 detektiert werden. Die Abbildung beschränkte sich daher auf Tag 4 nach eSAB, welche die ipsilaterale Hirnhemisphäre auf der Ebene des Hippocampus mit Abschnitt des Hypothalamus darstellte. Das Endothel wurde immunhistochemisch mit dem Endothelzellmarker CD31 und dem TJ-Molekül Cld5 angefärbt (Abb. 10).

Entlang der Gefäße konnte eine deutliche Akkumulation von Evans blue im Gehirnparenchym an Tag 4 nach eSAB detektiert werden, wobei zusätzlich die Cld5-Expression stark reduziert war (Abb. 10 A). Die respektive Kontrolle hingegen zeigte keine parenchymale Anreicherung von Evans blue und eine homogene Verteilung von Cld5 an Tag 4 (Abb. 10 B).

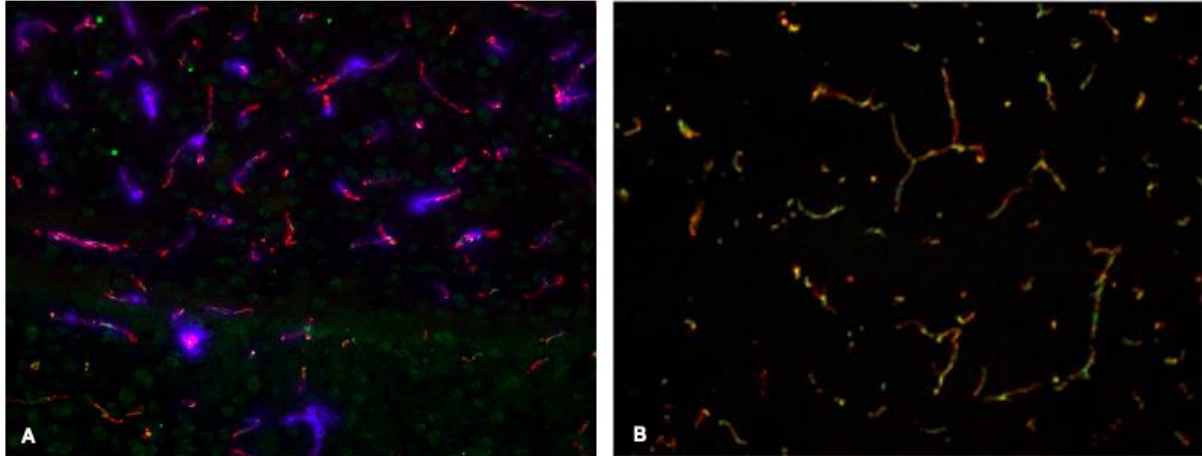


Abb. 10: Parenchymale Extravasation von Evans blue nach eSAB an Tag 4. (A) Koronarer Gefrierschnitt der ipsilateralen Hemisphäre auf Höhe des Hippocampus (Bregma - 2,1 mm bis - 2,5 mm) mit Abbildung des Hypothalamus. Das Endothel wurde mit dem Gefäßmarker CD31 (Cy3, rot) und Cld5 (DyLight 488, grün) angefärbt. Es zeigte sich eine perivaskuläre Akkumulation von Evans blue und eine verringerte Expression von Cld5. (B) Die *sham*-Kontrolle ergab keine Extravasation von Evans blue mit homogener Verteilung von Cld5.

3.3 Expressionsprofil der TJs Moleküle Cld5 und Ocld als molekulare Ursache des BHS-Zusammenbruchs nach eSAB

Im ersten Teil der Arbeit wurde durch die Charakterisierung der Extravasation von Evans blue ein BHS-Zusammenbruch nachgewiesen. In den folgenden Experimenten sollte nun untersucht werden, welche Moleküle für den Untergang der BHS verantwortlich sind. Die TJs-Moleküle Cld5 und Ocld gehören zu den wichtigsten Barriere-abdichtenden Komponenten der BHS. Der Schwerpunkt lag daher auf der Bestimmung der Expression von Cld5 und Ocld im zeitlichen Verlauf nach eSAB.

3.3.1 Regulation der Genexpression von Cld5 in BHS-Kapillaren

Die Genexpression der TJs konnte mittels quantitativer *real-time* PCR nach eSAB gemessen werden. Hierbei wurden Kapillaren aus Mausgehirnen an Tag 2, 4 und 7 nach eSAB isoliert. Die Expressionsanalyse ist als eine x-fache Veränderung im Verhältnis zur entsprechenden *sham*-Kontrolle, welche mit 1 gleichgesetzt wurde, dargestellt. Bereits an Tag 2 zeigte sich für Cld5 eine hochsignifikante Reduktion um das $0,3 \pm 0,1$ -fache (***) $p < 0,001$). An Tag 4 war eine leichte Reduktion von Cld5 detektierbar ($0,9 \pm 0,1$ -fach (* $p < 0,05$)), gefolgt von einem erneuten hochsignifikanten Absinken der Cld5-Expression an Tag 7 ($0,5 \pm 0,1$ -fach). Alle drei Zeitpunkte zeigten eine signifikante bis hochsignifikante Reduktion der Genexpression von Cld5 nach eSAB im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 11).

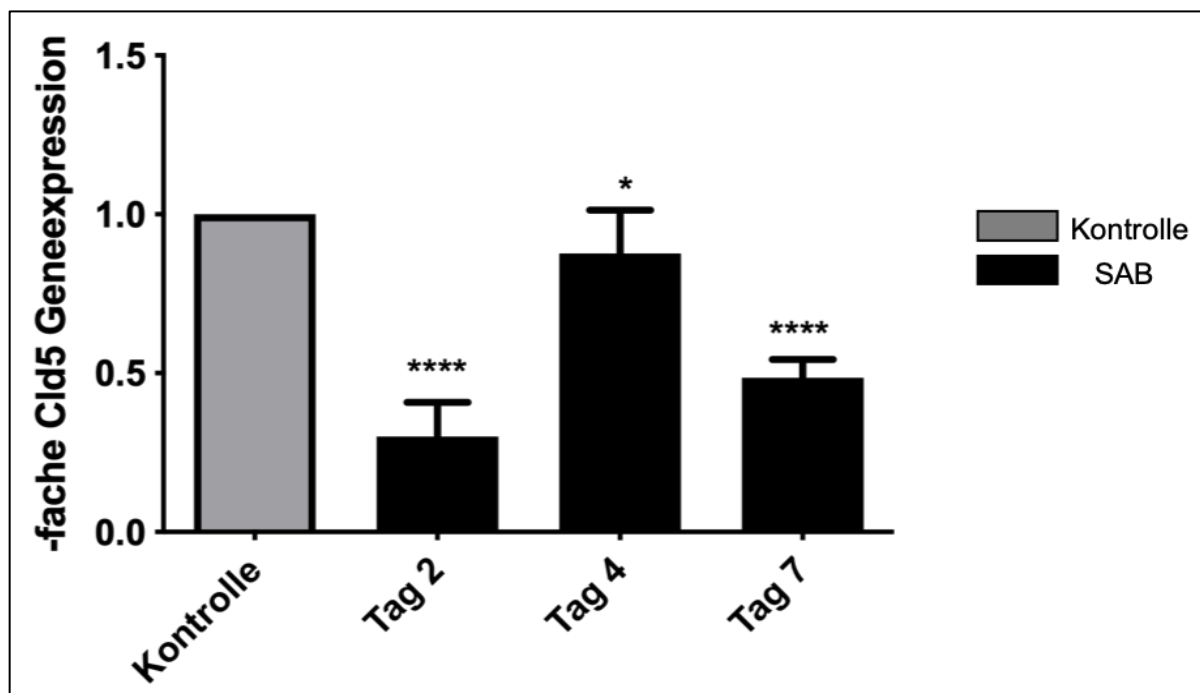


Abb. 11: Regulation der Genexpression von Cld5 an isolierten Gehirnkapillaren. Die quantitative *real-time* QT PCR zeigt die mRNA-Expression von Cld5. Eine hochsignifikante Reduktion ist an Tag 2 und 7 nach eSAB zu detektieren. Tag 4 zeigt einen Anstieg im Vergleich zu Tag 2 und 7, ist jedoch im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert; $n = 5$; (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ im Vergleich zur *sham*-Kontrolle).

3.3.2 Regulation der Genexpression von Ocld in BHS-Kapillaren

Anders als bei Cld5 konnte für Ocld keine signifikante Reduktion an den Tagen 2 und 4 nach eSAB detektiert werden. Tag 2 und 4 zeigten eine Hochregulierung der Ocld-Genexpression im Vergleich zur *sham*-Kontrolle, wobei Tag 2 signifikante Werte

präsentierte ($1,3 \pm 0,1$ -fach für Tag 2; $1,2 \pm 0,3$ -fach für Tag 4). Eine signifikante Reduktion der Ocln-Expression ($0,7 \pm 0,2$ -fach) konnte nur an Tag 7 nach eSAB beobachtet werden (Abb. 12).

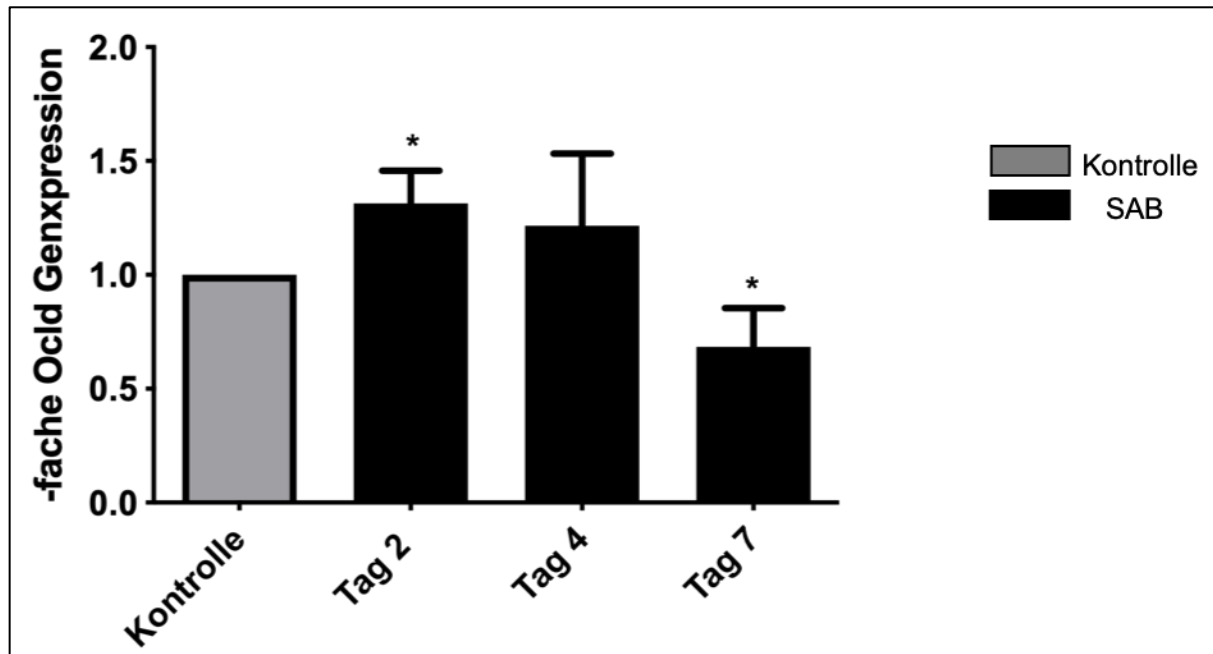


Abb. 12: Regulation der Genexpression von Ocln an isolierten Gehirnkapillaren. Die quantitative *real-time* QT PCR zeigt für Ocln eine signifikante Hochregulierung auf mRNA-Ebene an Tag 2. Nur für Tag 7 ist eine signifikante Reduktion der Expression zu beobachten; $n=5$, (* $p < 0,05$, im Vergleich zur *sham*-Kontrolle).

3.3.3 Immunhistochemie von Cld5 nach eSAB

Anschließend erfolgte die Expressionsbestimmung der TJs nach eSAB auf Proteinebene. Die Immunhistochemie wurde an koronaren Gefrierschnitten für die Zeitpunkte Tag 2, 4 und 7 nach eSAB durchgeführt. Die Abbildungen stellen jeweils die Immunhistochemie der ipsilateralen Gehirnhemisphäre nach eSAB dar (Abb. 13, unten) mit den jeweiligen *sham*-Kontrollen (Abb. 13, oben). Es wurde die anatomische Ebene auf Höhe des Hippocampus ausgewählt (Bregma - 2,1 mm bis - 2,5 mm). Um eine Endothelzell-spezifische Lokalisation von Cld5 detektieren und quantifizieren zu können, wurde zusätzlich eine Färbung mit CD31 durchgeführt (Abb. 13).

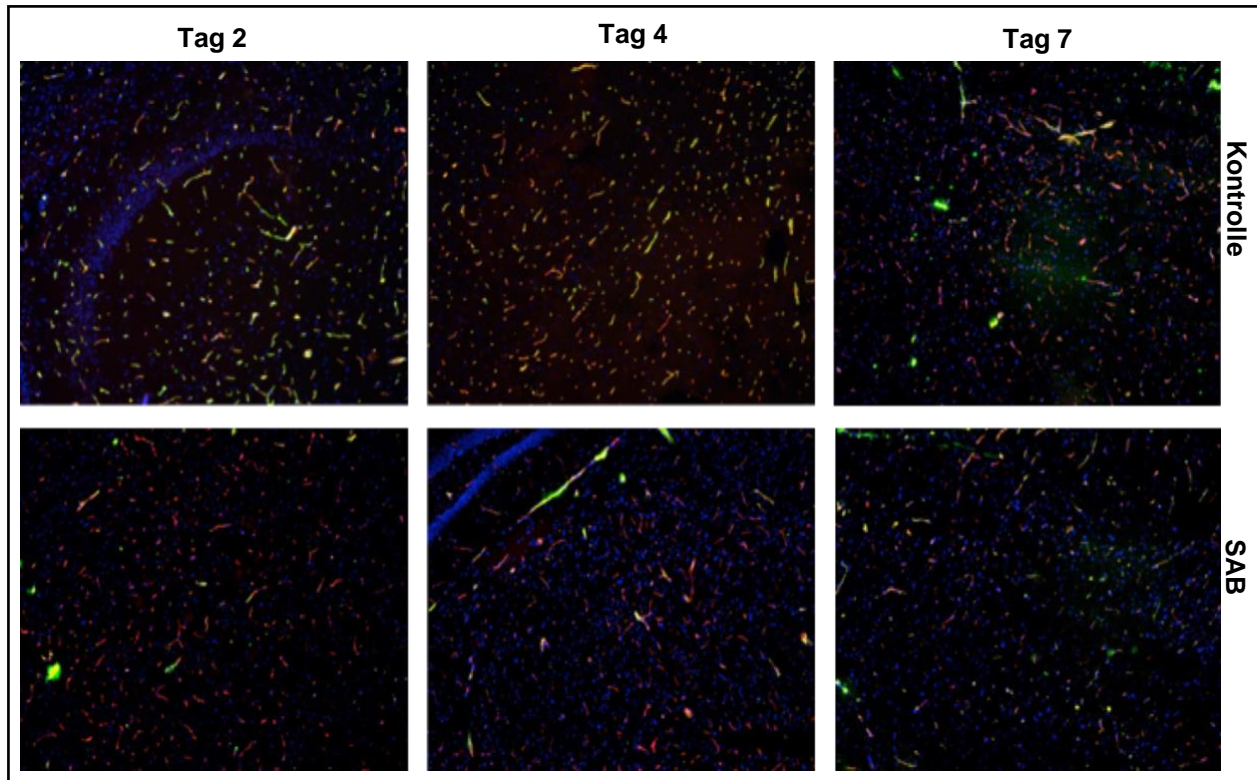


Abb. 13: Immunhistochemie von Cld5 nach eSAB. Die Fluoreszenzmikroskopaufnahmen des Hippocampus zeigen die Immunhistochemie von Cld5 (DyLight 488, grün) und CD31 (Cy3, rot) an Tag 2, 4 und 7 nach eSAB, im Vergleich mit der jeweiligen *sham*-Kontrolle. Die Kolo-kalisierung des Endothels mit Cld5 ist anhand der farblichen Überlappung zu erkennen (gelb).

Die Quantifizierung der Proteinexpression von Cld5 ermöglichte die Darstellung des alterierenden Fluoreszenzsignals der Immunhistochemie von Cld5, ins Verhältnis gesetzt mit der Fluoreszenz von CD31 (Abb. 14). Für die Quantifizierung wurden pro Hemisphäre drei Bilder der jeweiligen Ebene aus Hippocampus und Bregma ausgewählt. Die Auswertung ergab eine signifikante Reduktion von Cld5 bereits an Tag 2 nach eSAB auf $64,8 \pm 14,3$ % der Kontrolle, welche mit 100 % gleichgesetzt wurde. An Tag 4 und 7 konnte sogar eine hochsignifikante Herunterregulation ($75,4 \pm 12,8$ % für Tag 4 und $52,7 \pm 21,9$ % für Tag 7) detektiert werden (Abb. 14

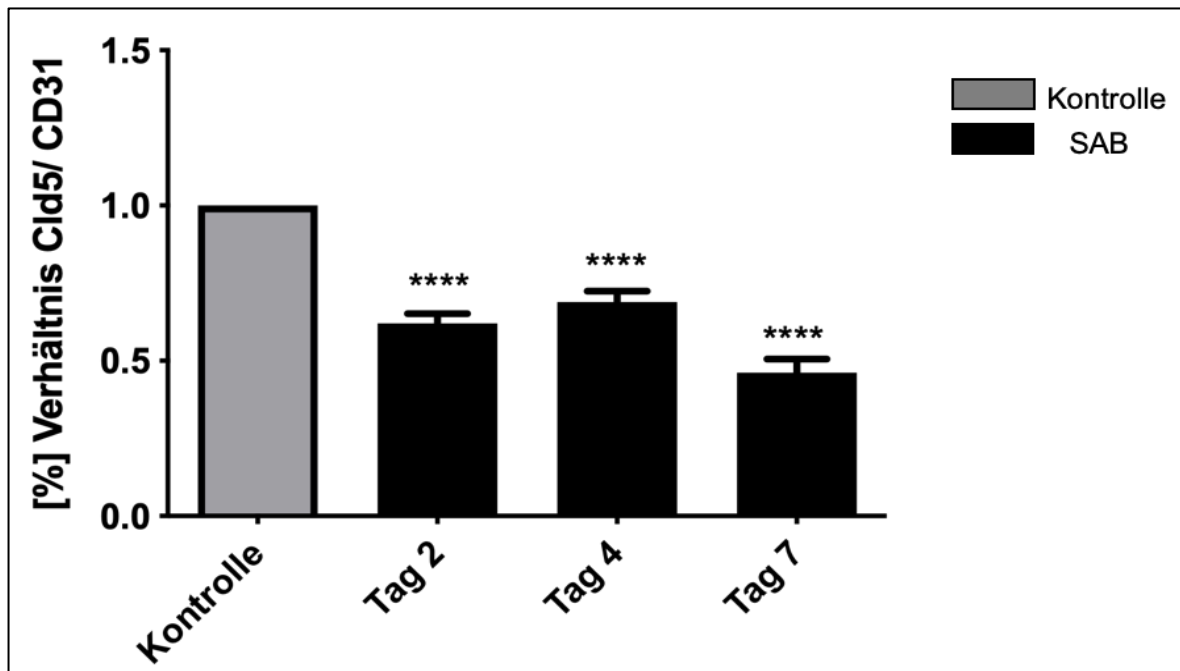


Abb. 14: Quantitative Analyse der Proteinexpression von Cld5. Das Verhältnis zwischen CD31 und Cld5 wurde mittels eines ImageJ Algorithmus bestimmt. Die Quantifizierung der Immunhistochemie (Abb. 13) wurde aus insgesamt drei Bildern pro Hemisphäre und anatomischer Ebene (Hippocampus und Bregma) durchgeführt. Es zeigt sich zu allen drei Zeitpunkten eine signifikante bis hochsignifikante Reduktion der Proteinexpression von Cld5 nach eSAB; $n = 5$ (**** $p < 0,0001$, im Vergleich zur *sham*-Kontrolle).

3.3.4 Immunhistochemie von Ocln nach eSAB

Analog zu Cld5 wurde die Proteinexpression von Ocln mittels Immunhistochemie analysiert. Der prozentuale Anteil von Ocln zu CD31 zeigte eine signifikante Reduktion nach eSAB zu allen drei Zeitpunkten. An Tag 2 nach eSAB war eine Herunterregulierung um $81,5 \pm 7,3 \%$, gefolgt von einer hochsignifikanten Reduktion an Tag 4 um $66,0 \pm 13,3 \%$ und an Tag 7 mit $66,1 \pm 7,9 \%$ zu detektieren, verglichen mit der entsprechenden *sham*-Kontrolle. Anders als bei Cld5 ist für Ocln keine Korrelation mit den Daten der mRNA-Expression erkennbar (Abb. 15 und 16). Die Quantifizierung der Proteinexpression von Ocln wurde ebenfalls durch ImageJ, nach der bereits beschriebenen Methode für Cld5 bestimmt.

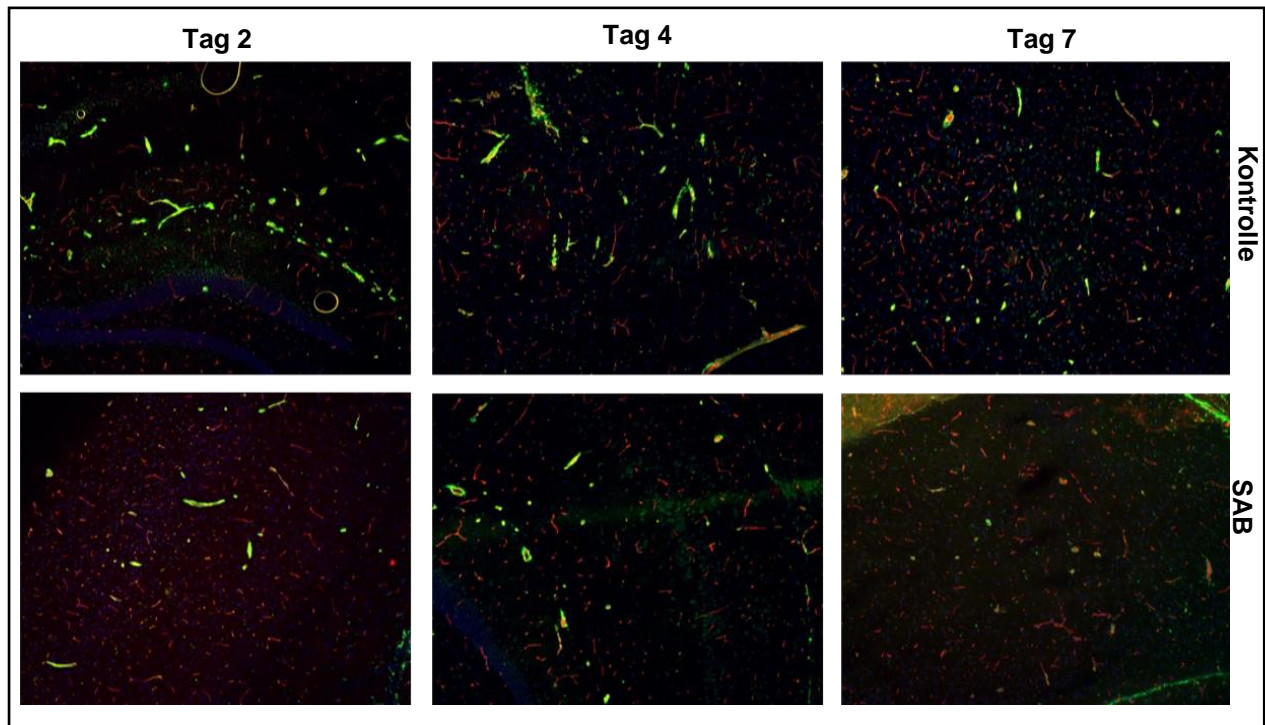


Abb 15: Immunhistochemie von Ocln nach eSAB. Die Darstellung durch das Fluoreszenzmikroskop zeigt die Histologie des Hippocampus (Bregma - 1,6 mm) an den Tagen 2, 4 und 7 nach eSAB, verglichen mit der jeweiligen *sham*-Kontrolle. Ocln = DyLight 488 (grün), CD31 = Cy3 (rot). Die Kolokalisierung des Endothels mit Ocln ist anhand der farblichen Überlappung zu erkennen (gelb).

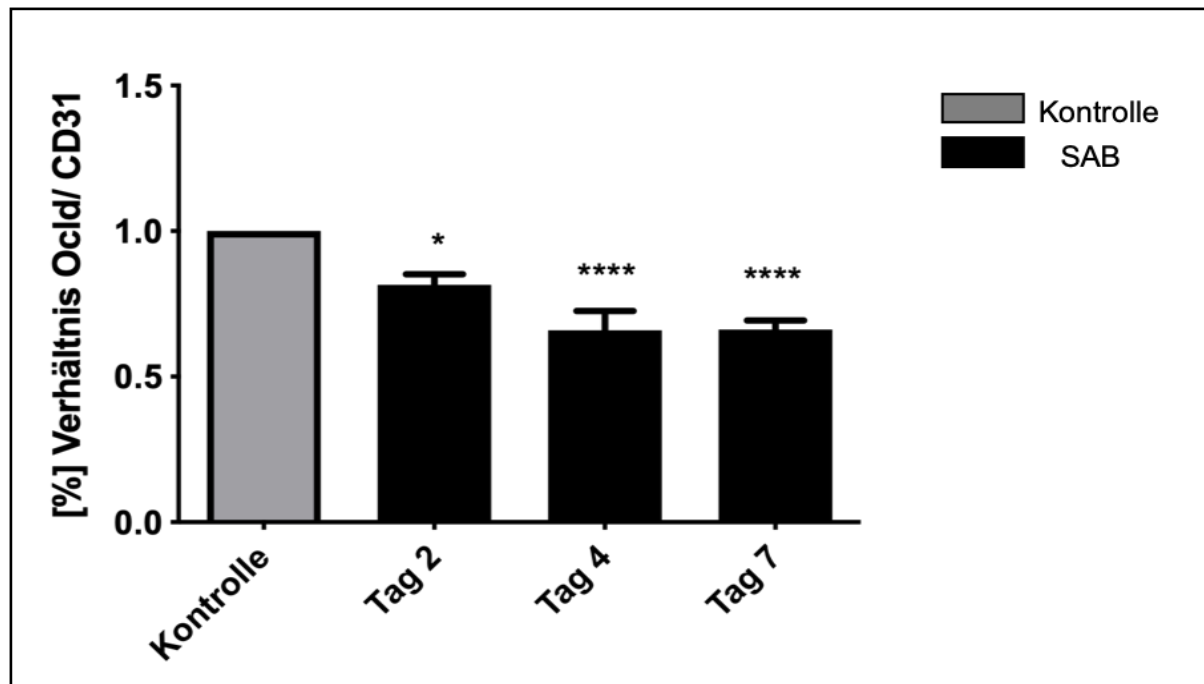


Abb. 16: Quantitative Analyse der Proteinexpression von Ocld. Es zeigt sich zu allen drei Zeitpunkten eine signifikante bis hochsignifikante Reduktion der Proteinexpression von Ocld nach eSAB im Verhältnis zum Endothel (CD31); $n=5$, ($*p < 0,05$, $**** p < 0,0001$, im Vergleich zur *sham*-Kontrolle).

3.4 Die Expression proinflammatorischer Zytokine nach eSAB

Die bisherigen Daten zeigten zunächst einen BHS-Zusammenbruch nach eSAB über die Bestimmung der Extravasation von Evans blue in das Gehirnparenchym. Zusätzlich konnten die Expressionsdaten der TJs Cld5 und Ocld einen BHS-Untergang auf mRNA- und Proteinebene nachweisen. Im folgenden Abschnitt sollte der Frage nachgegangen werden, ob ein Zusammenhang zwischen eSAB und der Expression essenzieller proinflammatorischer Zytokine existiert und ob eine erhöhte Expression von Zytokinen in Verbindung mit einem Defekt der BHS stehen könnte.

3.4.1 Überexpression von $TNF\alpha$, $IL1\beta$ und $IL6$ nach eSAB

Vorherige Arbeiten haben bereits den negativen Einfluss von hochregulierten Zytokinen auf die Expression BHS-abdichtender Moleküle wie die TJs nachweisen können. $TNF\alpha$, $IL1\beta$ und $IL6$ werden allesamt vom zerebralen Endothel exprimiert, wobei die Auswirkungen auf die BHS nach eSAB jedoch noch relativ unerforscht sind. Ein Endothelzell-spezifischer Nachweis der Expression von $TNF\alpha$, $IL1\beta$ und $IL6$ konnte über die Isolierung von Gehirnkapillaren der ipsilateralen Gehirnhemisphären aus eSAB- und *sham*-operierten Mäusen durchgeführt werden. Der zeitliche Verlauf wurde an den Tagen 2, 4 und 7 nach eSAB-Induktion mittels quantitativer *real-time* PCR analysiert. Das Expressionsprofil von $TNF\alpha$ ergab an Tag 2 und 4 im Vergleich zur *sham*-Kontrolle jeweils eine nicht signifikante Reduktion ($0,6 \pm 0,1$ -fach für Tag 2 und $1,2 \pm 0,7$ -fach für Tag 4) (Abb. 17 A). An Tag 7 nach eSAB konnte jedoch ein starker Anstieg der Expression von $TNF\alpha$ bei $4,6 \pm 1,4$ -fach im Vergleich zur *sham*-Kontrolle detektiert werden ($*** p < 0,001$).

Eine signifikante Überexpression von $IL1\beta$ wurde nach eSAB an den Tagen 2 und 4 ausgelöst. Dies betrug an Tag 2 das $2,0 \pm 0,2$ -fache und an Tag 4 nach eSAB das $2,6 \pm 0,9$ -fache, wobei Tag 7 eine Reduktion der $IL1\beta$ -Genexpression um das $0,6 \pm 0,2$ -fache der Kontrolle zeigte (Abb. 17 B). Im Fall von $IL6$ war zu allen 3 Zeitpunkten ein stetiger Anstieg der Genexpression nach eSAB zu beobachten, wobei die Expression an Tag 2 um das $2,1 \pm 0,9$ -fache erhöht war, gefolgt von einem weiteren Anstieg um $2,7 \pm 0,5$ -fache an Tag 4 und an Tag 7 um das $3,4 \pm 2,4$ -fache der *sham*-Kontrolle.

Dabei zeigte ausschließlich Tag 7 einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur entsprechenden *sham*-Kontrolle (Abb. 17 C).

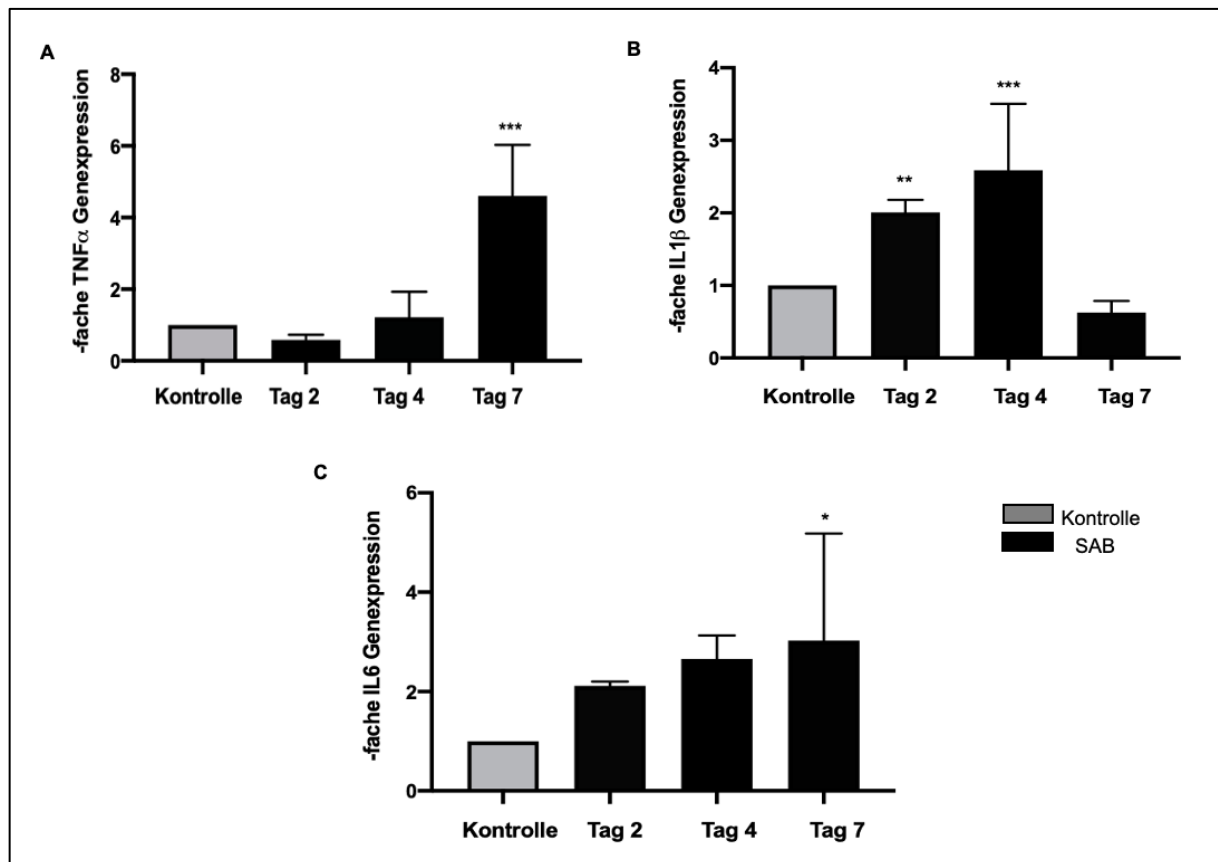


Abb. 17: Überexpression von TNF α , IL1 β und IL6 nach eSAB. Quantitative *real time* PCR von isolierten Gehirnkapillaren nach eSAB im zeitlichen Verlauf zeigen das Expressionsprofil von (A) TNF α mit hochsignifikanter Erhöhung an Tag 7, (B) IL1 β mit Reduktion an Tag 7 und erhöhter Genexpression an den Tagen 2 und 4, (C) IL6 mit kontinuierlichem Anstieg ab Tag 2 und signifikanter Erhöhung an Tag 7; n= 5, (**p < 0.01, *** p < 0.001, im Vergleich zur *sham*-Kontrolle).

3.4.2 Anreicherung von IL6 Vesikeln im Gehirndothel nach eSAB

Unter physiologischen Umständen ist die endothelzellspezifische Expression von IL6 verhältnismäßig gering, verglichen mit der Expression, die von anderen Zelltypen ausgeht. Die vorliegenden PCR-Daten zeigten eine starke Überexpression von IL6 nach eSAB. In einem weiteren Schritt sollte immunhistochemisch die subzelluläre Lokalisation von IL6 in isolierten Gehirnkapillaren nach eSAB nachgewiesen werden. Um die isolierten Zellen als Endothelzell-spezifisch detektieren zu können, wurde eine Doppelmarkierung mit dem Plaque-Protein ZO1 (Zonula Occludens 1) als Endothel-

zellmarker durchgeführt (Abb. 18). An den Tagen 2 und 4 nach eSAB zeigte sich jeweils eine deutlich stärkere Signalanhebung für IL6 im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Die IL6-Anreicherung konnte entlang der Kapillarstruktur in Form von Vesikeln lokalisiert werden. In den jeweiligen Kontrollen war die Anzahl der IL6-Vesikel für beide Zeitpunkte deutlich geringer.

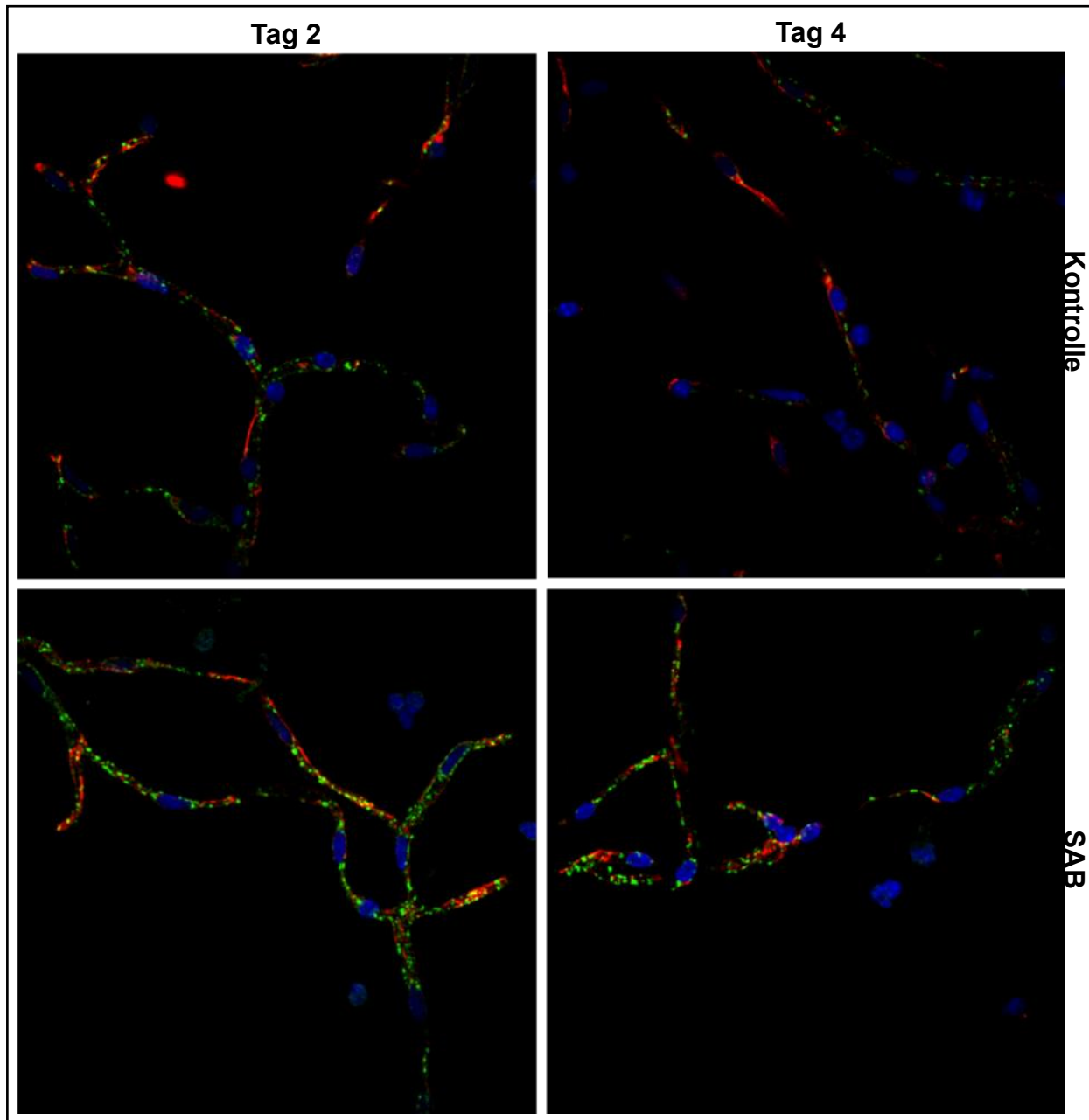


Abb 18: Akkumulation perivaskulärer IL6-Vesikel entlang von Gehirnkapillaren nach eSAB. Die Immunhistochemie der isolierten Kapillaren nach eSAB zeigt IL6 = DyLight 488 (grün), ZO1 = Cy3 (rot), DAPI (blau) mit einer Signalanhebung für IL6 an Tag 2 und 4 nach eSAB, im Vergleich zur Kontrolle.

3.5 IL6 als Ursache des Zusammenbruchs der Hirnendothelzellbarriere

Die In-vivo-Experimente zeigten einen BHS-Zusammenbruch auf zellulärer und molekularer Ebene nach eSAB mit einer gleichzeitigen Aktivierung proinflammatorischer Zytokine. Hierbei wurde zum ersten Mal die Anreicherung von IL6-Vesikeln im Gehirnendothel nach eSAB detektiert. Die anschließenden In-vitro-Experimente dienten dazu, herauszufinden, ob eine erhöhte IL6-Konzentration zu einer Störung der BHS verursacht. Hierfür wurde die Hirnendothelzellbarriere cEND mit dem rIL6-Protein behandelt und an unterschiedlichen Konzentrationen und Zeitabständen untersucht.

3.5.1 Die cEND-Zellviabilität unter dem Einfluss von rIL6

Zunächst erfolgte die Applikation von rIL6 an der cEND-Zelllinie mit der Inkubation aufsteigender Konzentrationen von 5, 10, 25, 50 und 100 ng/mL über einen Zeitraum von 24 Stunden. Anschließend wurde die Zellviabilität der cEND-Zellen unter der Verwendung des MTT-Proliferations-Assays getestet, um die optimale Konzentration von rIL6 für die weiteren Experimente bestimmen zu können. Wie in Abbildung 19 dargestellt, zeigt sich eine unveränderte cEND-Zellviabilität für die rIL6 Konzentrationen von 5 und 10 ng/mL, wobei eine leichte Reduktion bei 25 ng/mL festzustellen ist. Höhere Konzentrationen wie 50 ng/mL und 100 ng/mL zeigten einen signifikanten Abfall der cEND-Zellviabilität. Infolge dieser Daten wurde für die weiteren Experimente eine rIL6-Konzentration von 25 ng/mL verwendet.

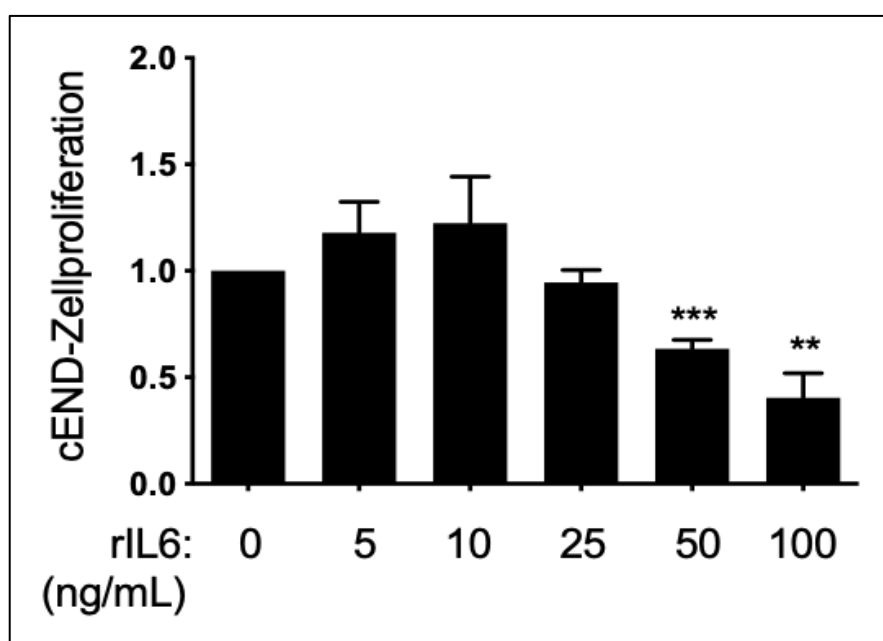


Abb 19: Konzentrationsreihe von rIL6 und Ermittlung der cEND-Zellviabilität. Für die Testung der Zellviabilität von cEND-Zellen unter rIL6-Einfluss, wurde an einem konfluierenden Monolayer die folgenden rIL6-Konzentrationen von 5, 10, 25, 50 und 100 ng/mL über 24 Stunden in der Zellkultur inkubiert. Mittels des MTT Proliferations-Assays konnte die optimale Konzentration von 25 ng/mL bestimmt werden, $n = 3$; Experimente wurden in unabhängigen Triplikaten durchgeführt.

3.5.2 Zeitabhängige Reduktion der cEND-Zellviabilität unter rIL6

Um die Zellviabilität der cEND-Zellen im zeitlichen Verlauf unter der Behandlung mit rIL6 bestimmen zu können, wurde erneut ein MTT-Proliferations-Assay durchgeführt. Nach 48-stündiger Behandlung mit rIL6 (25 ng/mL) zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion der Zellviabilität um circa 40 % im Vergleich zur Kontrolle ($59,6 \pm 8,6 \%$ *** $P \leq 0.001$), welche mit 100 % gleichgesetzt wurde (Abb. 20).

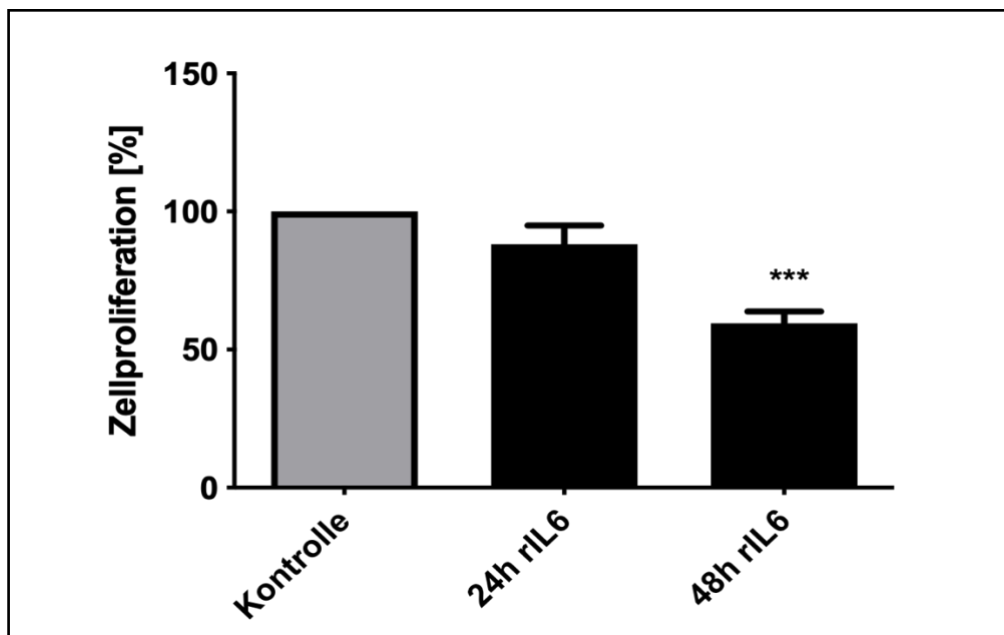


Abb 20: Verminderte Zellviabilität unter rIL6-Behandlung im zeitlichen Verlauf. Die prozentuale Zellproliferation der cEND-Zellen zeigte eine hochsignifikante Reduktion nach 48 Stunden rIL6-Behandlung (25 ng/mL) um circa 40 % (***) $P \leq 0.001$, im Vergleich zur Kontrolle).

3.5.3 Reduktion des TEER im zeitlichen Verlauf unter rIL6

Der Monolayer der cEND-Zellen zeichnet sich durch seinen hohen TEER aus und bildet ein geeignetes Zellkulturmodell, um Permeabilitätsveränderungen der endothelialen Barriere experimentell untersuchen zu können. Eine Reduktion des TEER In vitro innerhalb der cEND-Zellkultur kann mit einer erhöhten Permeabilität der

BHS In vivo in Verbindung gebracht werden. Um die Barriereigenschaften der Endothelzellbarriere der cEND-Zellen unter dem Einfluss von rIL6 untersuchen zu können, wurde die TEER-Messung unter rIL6-Behandlung (25 ng/ml) an der Zelllinie nach 8, 24 und 48 Stunden durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine Reduktion des TEER zu allen drei Zeitpunkten. Nach 24 Stunden war eine signifikante Reduktion zu detektieren, welche nach 48 Stunden hochsignifikant im Vergleich zur *sham*-Kontrolle war (Abb. 21).

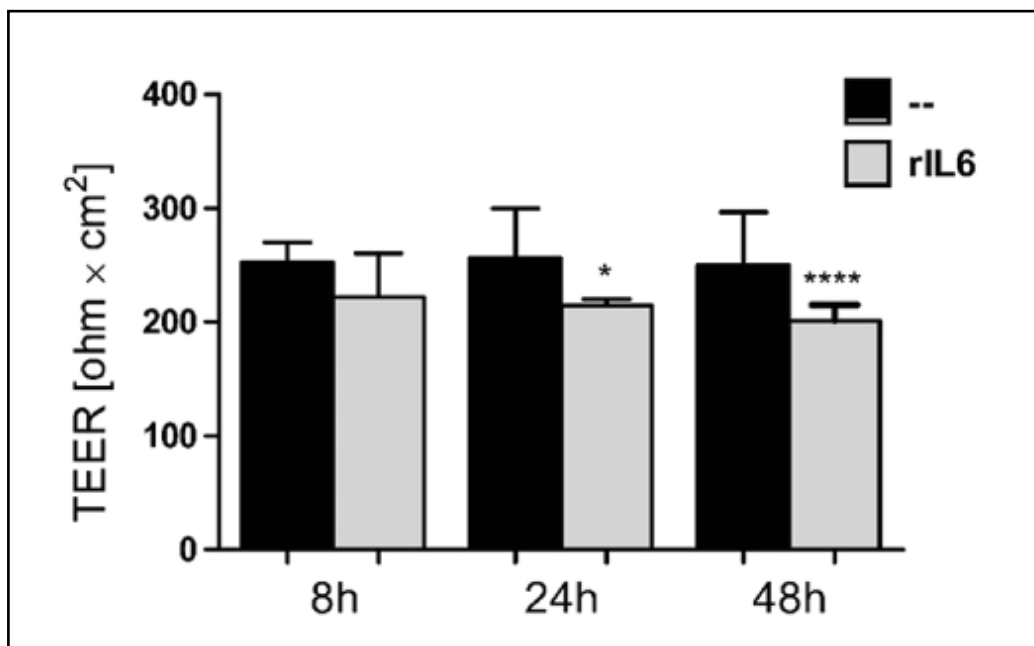


Abb 21: TEER unter rIL6-Gabe im zeitlichen Verlauf. Die Messungen im zeitlichen Verlauf über 48 Stunden zeigen einen reduzierten TEER zu allen drei Zeitpunkten, mit signifikantem Abfall nach 24 Stunden und hochsignifikantem nach 48 Stunden. Drei unabhängige Experimente wurden mit einer Anzahl von drei Proben pro Gruppe (Triplikaten) durchgeführt, n= 9 (** P ≤ 0.01 im Vergleich zur *sham*-Kontrolle).

3.5.4 Einfluss von rIL6 auf die Genexpression von Cld5 und Ocld in cEND-Zellen

Im Folgenden wurde nun die Genexpression der TJs Cld5 und Ocld nach rIL6-Applikation im zeitlichen Verlauf mittels qPCR untersucht. Zu allen drei Zeitpunkten ist eine Reduktion der Cld5-Expression unter der Behandlung mit rIL6 detektierbar ($0,6 \pm 0,1$ -fach nach acht Stunden, $0,7 \pm 0,2$ -fach nach 24 Stunden, $0,7 \pm 0,1$ -fach nach 48 Stunden), wobei nur nach acht und 24 Stunden signifikante Werte zu verzeichnen sind. Die Behandlung der cEND-Zelllinie mit rIL6 verursachte eine stärkere Reduktion der Ocld-Genexpression ebenfalls zu allen drei Zeitpunkten.

Hierbei zeigten sich im gesamten zeitlichen Verlauf hochsignifikante Werte ($0,6 \pm 0,03$ -fach nach acht Stunden, $0,4 \pm 0,02$ -fache nach 24 Stunden, $0,3 \pm 0,1$ -fach nach 48 Stunden) (** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ im Vergleich zur *sham*-Kontrolle).

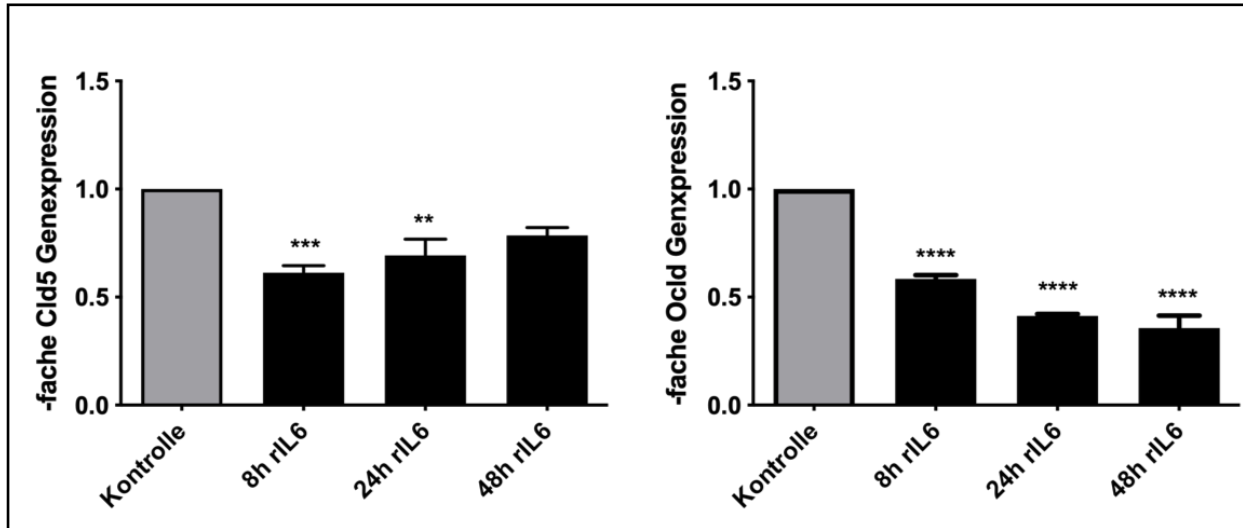


Abb 22: Genexpression der TJs Cld5 und Ocln unter rIL6-Einfluss. (A) Die Genexpression von Cld5 zeigte eine signifikante Reduktion nach acht- und 24-stündiger Behandlung mit rIL6. (B) Eine hochsignifikante Reduktion der Genexpression nach rIL6-Gabe lässt sich für Ocln zu allen drei Zeitpunkten beobachten (** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$ im Vergleich zur Kontrolle).

4. Diskussion

Trotz erheblicher Fortschritte in der Neurointensivmedizin in Bezug auf Diagnostik und Therapie der aSAB in den letzten Jahrzehnten, existiert bis heute keine spezifische therapeutische Intervention für aSAB-Patienten, weshalb die aSAB weiterhin eine medizinische Herausforderung darstellt. Die Morbidität und Mortalität konnte für aSAB-Patienten im Allgemeinen reduziert werden, die Pathomechanismen, die zu einer frühen Hirnschädigung führen, bleiben jedoch unzureichend geklärt. Angiographische Studien deuteten lange Zeit darauf hin, dass der Vasospasmus nach aSAB die Hauptursache für die neurologischen Defizite und eine schlechte klinische Prognose verantwortlich ist. Heute ist jedoch bekannt, dass die erfolgreiche Reduktion des Vasospasmus das Outcome bei aSAB-Patienten nicht signifikant verbessert. Daher sind präklinische Studien zur aSAB erforderlich, um Einblicke in die molekularen und zellulären Veränderungen zu gewinnen. Jüngste Publikationen weisen auf multifaktorielle Ursachen wie strukturelle und funktionelle Veränderungen der neurovaskulären Einheit hin, die zu Neuroinflammation, BHS-Dysfunktion und übermäßigem Hirnödem führen (Li et al., 2020).

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Bestimmung der BHS-Eigenschaften unter dem Einfluss von Entzündungsmediatoren nach eSAB, wobei zum ersten Mal gezeigt wurde, dass IL6 vom Hirnendothel selbst nach eSAB exprimiert wird und zeitgleich mit einem BHS-Zusammenbruch korreliert. Die Ergebnisse der Extravasations-Experimente ergaben einen deutlichen Durchtritt von Evans blue mit einem deutlichen Anstieg der BHS-Permeabilität nach eSAB über den gesamten Zeitraum. Die Herunterregulierung der zwei wichtigsten TJs Cld5 und Ocld wurde im zeitlichen Verlauf sowohl quantitativ mittels qPCR-Analysen, als auch qualitativ über Immunhistochemie nach eSAB bestätigt. Darüber hinaus korrelierte die BHS-Störung zeitgleich mit einer Hochregulierung von essenziellen Zytokinen. Diesbezüglich offenbarte die Analyse an isolierten Gehirnkapillaren nach eSAB einen deutlichen Anstieg der IL6-Expression zu allen Zeitpunkten. Hiermit konnte bewiesen werden, dass IL6 endothelzellspezifisch ist und in Vesikeln isolierter Gehirnkapillaren nach eSAB angereichert wird. Die nachfolgenden In-vitro-Versuche demonstrierten einen deutlichen Verlust des TEER in der cEND-Zellkultur, nachdem die Zellen mit rIL6 behandelt wurden. Auch die Zellviabilität der cEND-Zellen war unter der Behandlung

mit rIL6 um bis zu 40% reduziert. In vitro konnte ebenfalls ein Untergang von Cld5 und Ocl6 beobachtet werden. Grundlage für diese Dissertation stellte die publizierte Arbeit der AG um Ulf Schneider dar, wobei zu späteren Zeitpunkten zwischen Tag 7 und 14 eine mikrogliale, extravaskuläre Hochregulierung von $TNF\alpha$, $IL1\beta$ und IL6 nach eSAB detektiert wurde. Daraufhin ergab sich die Fragestellung, ob zu früheren Zeitpunkten bereits eine intravaskuläre Inflammation mit einem Defekt der BHS nach eSAB zu beobachten ist. Von klinischer Perspektive her erwies sich außerdem ein erhöhtes IL6 im Liquor und im Serum bei aSAB-Patienten als prognostisch ungünstiger Faktor in Bezug auf das klinische Outcome (Wang et al., 2018; A. Sarrafzadeh et al., 2010). Aufgrund der heutigen Forschungsergebnisse wissen wir, dass Entzündungsmediatoren zu Permeabilitätsveränderungen der BHS, gefolgt von einer frühen Hirnschädigung nach aSAB führen, wobei die genauen Pathomechanismen bis heute nur unzureichend verstanden werden (Obermeier et al., 2013; Edvinsson & Povlsen, 2011).

4.1 Eignung und kritische Aspekte des Fadenperforationsmodells

Das endovaskuläre Fadenperforationsmodell für die Induktion der eSAB an Nagetieren erwies sich als der populärste experimentelle Ansatz, um die Reproduktion pathophysiologischer Eigenschaften nach einer akuten Aneurysma-Ruptur des Menschen zu simulieren (Peng et al., 2019; Sehba 2015). Das Modell hat den klaren Vorteil, dass es die Fähigkeit besitzt, eine EBI, beginnend mit der Gefäßruptur und der schlagartigen Blutansammlung im Subarachnoidalraum, sowie die Veränderung der zerebralen Druckphysiologie zu reproduzieren. Dennoch sind einige Nachteile gegenüber dem Modell zu erwähnen, wie beispielsweise die hohe Anforderung zur Erlernung der Operation, gefolgt von einem intensiven Zeitaufwand, der für die anfängliche Übung nötig ist, um die erforderliche Präzision für die Ausführung der Induktion zu erlangen. Zusätzlich ist die Standardisierung des eSAB-Schweregrads auch für den erfahrenen Operateur eine Herausforderung, da das Abschätzen der Menge des extravasierenden Blutvolumens nicht vorhersehbar ist. Ein weiterer Faktor ist eine hohe Variabilität der Mortalität unter der Anwendung des Fadenperforationsmodells, im Vergleich zu anderen eSAB-Modellen (Muroi et al., 2014). Mehrere Studien verweisen auf eine hohe Mortalität unter der Anwendung des Fadenperforationsmodells bei Nagetieren, wobei eine starke Variabilität zwischen 6% und 100% beschrieben wird (Leclerc et al., 2018; Schöller et al., 2011).

Dennoch berichten die meisten Gruppen von einer durchschnittlichen Mortalität von 10-30% innerhalb der ersten zweiundsiebzig Stunden, wobei sich die Mortalitätsrate in unserer Arbeitsgruppe mit 16% ebenfalls befindet (Blecharz-Lang et al., 2018; Muroi et al., 2014). Für zukünftige experimentelle Studien mit Anwendung des Fadenperforationsmodells wäre es sinnvoll, den Schweregrad der Blutung und die Mortalität des Tieres besser abschätzen zu können. Hierfür ist die Messung des Hirndrucks (ICP) und des zerebralen Blutflusses (CBF) geeignet, wobei bekannt ist, dass die Überlebenschance des Tieres in den ersten vierundzwanzig Stunden gegen Null ist, wenn die Erholung des Hirndrucks weniger als 40 % beträgt. Auch die Durchführung einer regelmäßigen Kontrolle von neurologischen Defiziten nach eSAB erwies sich als hilfreicher prognostischer Marker in den ersten Stunden bis Tagen (Matsumura et al., 2019; Sebha, 2015). Darüber hinaus sind die Fähigkeiten des Operateurs, die chirurgischen Instrumente und die Form des Perforationsfilaments ebenfalls von entscheidender Bedeutung in Bezug auf Schweregrad und Mortalität der induzierten eSAB. Das Fadenperforationsmodell ist daher aufgrund seiner Komplexität limitiert und verdeutlicht die Schwierigkeit einer Standardisierung.

Selektive Mechanismen können mitunter gezielter über die Anwendung von Blutinjektionsmodellen untersucht werden, wobei ein festgelegtes Blutvolumen mit einem bestimmten Injektionsdruck in den Subarachnoidalraum injiziert wird. Beispielsweise wird in einem der vielen Injektionsmodelle Blut über die atlanto-occipitale Membran in die Cisterna magna verabreicht, während ein anderer Zugang Blut über die prächiasmatische Zisterne stereotaktisch appliziert (Kamp et al., 2014). Nebst der relativ einfachen Durchführung und einer guten Reproduzierbarkeit der Injektionsmodelle, kann zusätzlich von einer signifikant niedrigeren Mortalität (25 % im prächiasmatischen Modell und 0 % im Cisterna magna Modell) berichtet werden (Prunell et al., 2003). Hierbei ist eine niedrigere Mortalität wohlmöglich dadurch zu erklären, dass die Tiere einem kürzeren und weniger invasiven Eingriff ausgesetzt sind. Zusätzlich konnte eine schnellere Erholung des CBF bereits nach fünfzehn Minuten nach eSAB unter Anwendung der Injektionsmodelle beobachtet werden, während im Fadenperforationsmodell erst nach neunzig Minuten ein CBF von 90 % des Ausgangswertes festgestellt werden konnte (Prunell et al., 2003). Dennoch modellieren Injektionsmodelle keine Aneurysma-Ruptur beim Menschen und reproduzieren keine zerebrovaskuläre Erkrankung in dem Sinne. Das Fadenperforationsmodell ist daher nach wie vor das am häufigsten angewandte und

aussagekräftigste Modell für Fragestellungen in Bezug auf die EBI nach aSAB, wobei zunehmend Verbesserungen der Operationstechnik vorgenommen werden, um Verletzungen der Gefäße während des Eingriffs zu minimieren und das Leiden der Tiere zu minimieren (Peng et al, 2019; Lee et al, 2009).

4.2 Evans blue Extravasation als initiales Indiz eines BHS-Defekts nach eSAB

Klinische Studien an der BHS nutzen häufig die Methode des diffusionsgewichteten MRT, wodurch eine BHS-Störung in Form eines Hirnödems nach aSAB detektiert werden kann (Liu et al., 2007). Experimentell werden Veränderungen der BHS oft mit Hilfe der Extravasation von Makromolekülen oder der Bestimmung von TJs und AJs am Versuchstier ermittelt (Yuan et al., 2017; Schöller et al., 2007). Hirnvolumenmessungen oder MRT-Studien sind etablierte Methoden, um die Entstehung eines Hirnödems an der Maus In vivo zu untersuchen (Egashira et al., 2015).

Dieser Teil der Arbeit konzentrierte auf die quantitative Einschätzung des BHS-Zusammenbruchs nach eSAB unter der Anwendung der Methode der Extravasationsbestimmung von Evans blue mittels Absorptionschromatographen. Die Messung der Extravasation wurde an den Tagen 2, 4 und 7 anhand von Gewebehomogenaten nach eSAB durchgeführt. Hierbei zeigten die Ergebnisse einen Anstieg der Extravasation an Tag 2 und Tag 4 nach eSAB, wobei an Tag 7 kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle erkennbar war. Eine erhöhte BHS-Permeabilität konnte demnach nur an den Tagen 2 und 4 nach eSAB nachgewiesen werden, mit signifikanten Werten an Tag 4. Anhand dieser ersten Resultate konnte geschlussfolgert werden, dass aufgrund der deutlichen Extravasation das Fadenperforationsmodell eine geeignete Methode für die Untersuchung der BHS-Störung nach eSAB darstellt. Aufgrund der signifikanten Extravasation an Tag 4 wurde folglich die qualitative Bestimmung über die Anwendung von immunhistochemischen Verfahren an koronaren Gefrierschnitten durchgeführt, um insbesondere die Verteilung der Extravasation im Hirnparenchym zu visualisieren. Eine maximale Extravasation in Form der Signalintensität von Evans blue zeigte sich ebenfalls an Tag 4 nach eSAB in der Immunhistochemie, weshalb sich die Abb.10 auf Tag 4 nach eSAB konzentrierte. Zur Darstellung kam hier die ipsilaterale Hirnhemisphäre auf der Ebene des Hippocampus mit maximaler Intensität der Evans blue Fluoreszenz in der Region des Hypothalamus (Abb. 10).

Die Akkumulation von Evans blue zeigt sich entlang der Kapillaren, wobei sich hier bereits eine Reduktion von Cld5 nach eSAB im Vergleich zur Kontrolle ankündigt. Cld5 wurde in den nachfolgenden Versuchen als eines der TJ Moleküle identifiziert, was mit für den Untergang der BHS verantwortlich ist.

In der Literatur wurde bislang nur ein Defekt der BHS nach 24 oder 48 Stunden nach eSAB untersucht, wobei ein Verlauf über einen längeren Zeitraum der BHS-Dysfunktion nach eSAB bisher nicht gezeigt wurde. Insbesondere die Variabilität des Fadenperforationsmodells verursacht große Abweichungen der Ergebnisse mit zeitlich unterschiedlichem Anstieg zwischen den einzelnen Studien. Dennoch konnte stets eine Störung der BHS nach eSAB unter Anwendung des Fadenperforationsmodells nachgewiesen werden (Yuan et al., 2017; Egashira et al., 2015; Schöller et al., 2007). Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigten ein signifikantes Maximum der Extravasation an Tag 4. Dennoch ergaben die Auswertungen eine hohe Standardabweichung, was wahrscheinlich durch eine zu niedrige Tierzahl ($n = 6$) zu begründen ist. In weiterführenden Experimenten innerhalb unserer Forschungsgruppe zeigte eine erhöhte Tierzahl ($n = 9$) eine signifikante Evans blue Extravasation auch an Tag 2 nach eSAB im Vergleich zur *sham*-Kontrolle, wobei hier der Zeitpunkt der maximalen Extravasation bei Tag 2, anstatt Tag 4 lag (Blecharz-Lang et al., 2018). Um signifikante Werte auch in Zukunft zu erzielen, muss für weiterführende Studien eine höhere Tierzahl für die Experimente gewählt werden. Pang et al. zeigten ein signifikant erhöhte Extravasation ebenfalls an Tag 2 nach eSAB (Pang et al., 2017). Obwohl fluoreszierende Marker in unterschiedlichen molekularen Größen zu Verfügung stehen, wurden für eSAB-Experimente nur Marker mit einer Größe von 70 kD verwendet. Ein Grund hierfür ist das Fehlen einer erfolgreichen Etablierung von Protokollen mit anderen Markermolekülen, wobei die post mortem Fixierung des Gewebes mitunter schwierig ist. Die Evans blue Methode ist jedoch gut etabliert, unter den Laboren weit verbreitet und preiswert zugleich. Es wäre jedoch von Interesse zu untersuchen, ob auch Marker mit niedriger molekularer Größe zu späteren Zeitpunkten die BHS nach eSAB passieren, wenn bereits größere Moleküle (70 kD) nicht mehr durchdringen können. Dies ließe in Zukunft eine genauere Charakterisierung der BHS-Permeabilitätsveränderungen im zeitlichen Verlauf nach eSAB zu.

4.3 Permeabilitätsstörung der Endothelzellbarriere In vitro

Nachdem ein BHS-Defekt durch die Extravasationsexperimente In vivo bestätigt wurde, konnte parallel eine erhöhte IL6-Expression in isolierten Gehirnkapillaren über den gesamten Zeitraum qualitativ als auch quantitativ an den Tagen 2, 4 und 7 nach eSAB nachgewiesen werden (Abb. 17, 18). Die Ergebnisse deuteten auf eine intravaskuläre, durch IL6 ausgelöste Inflammation hin, worauf eine Störung der BHS nach eSAB folgte. Um der Hypothese weiterhin zu untermauern, sollten die Auswirkungen einer intravaskulären Inflammation über die Applikation von rIL6 auf die interzellulären Eigenschaften der Endothelzellbarriere In vitro bestimmt werden.

Hierfür wurde die immortalisierte cEND-Zelllinie genutzt, welche ein In-vitro-Modell der BHS darstellt (Förster et al., 2005). Die Anwendung eines homogenen und kontrollierten Modells bietet standardisierte Bedingungen und ermöglicht die Untersuchung einzelner inflammatorischer Mediatoren, wobei hier ausschließlich die Auswirkung von rIL6 auf das Endothel untersucht wurde. Nachdem die geeignete IL6-Konzentration von 25 ng/mL mit Hilfe des MTT-Proliferations-Assays ermittelt werden konnte (Abb. 19), erfolgte die Bestimmung der Zellproliferation und des TEER an den cEND-Zellen im zeitlichen Verlauf. Hierbei stand der Verlust der endothelzellspezifischen Eigenschaften an einem intakten Gehirnendothelzell-*Monolayer*, sowie die Viabilität der Endothelzellen im Vordergrund. Die Bestimmung des TEER stellt ein modellhaftes und funktionelles Korrelat der abdichtenden Eigenschaften der BHS In vitro dar. Unter physiologischen Bedingungen ist der Zellverband aufgrund intakter TJs und AJs äußerst dicht, was mit einem hohen Widerstand einhergeht. Die Ergebnisse zeigten einen erheblichen Verlust des TEER unter der Behandlung mit rIL6 nach 8, 24 und 48 Stunden (Abb. 21). Hiermit konnte bestätigt werden, dass rIL6 tatsächlich zu einem Verlust der cEND-Endothelzellbarriere führte, wobei eine erhöhte IL6-Expression und eine BHS-Störung bereits In vivo nach eSAB nachgewiesen wurde.

4.4 Die Expression von Cld5 und Ocld im Endothelzellverband

Im Anschluss an die erfolgreiche Detektion eines BHS-Schadens In vivo und In vitro, wurde nun untersucht, welche strukturellen Veränderungen für den BHS-Zusammenbruch verantwortlich sind. TJs und AJs sind als essenzielle BHS-Proteinkomplexmoleküle für die Dichtigkeit verantwortlich.

Eine BHS-Störung mit Herunterregulierung der TJs und AJs konnte bereits in mehreren Krankheitsmodellen wie auch bei der eSAB nachgewiesen werden (Blecharz-Lang et al., 2018; Coisne & Engelhardt, 2011; Zlokovic, 2008). Die TJs Cld5 und Ocld gehören zu den wichtigsten Vertretern in Bezug auf die Barriereeigenschaften der BHS (Pan et al., 2017; Förster, 2008; Wolburg & Lippoldt, 2002). Daher wurde sich im Rahmen dieser Arbeit auf die endotheliale Expression dieser beiden Moleküle konzentriert. Für die quantitative Expressionsbestimmung konnte die direkte Isolierung von Gehirnkapillaren verwendet werden. Die Daten der *real-time* PCR zeigten zu allen 3 Zeitpunkten eine Reduktion der Genexpression für Cld5, wobei Ocld nur an Tag 7 reduziert war. Stattdessen ergaben die Auswertungen für Tag 2 und 4 eine Erhöhung der Ocld-Expression. Ob es sich hierbei um einen möglichen Kompensationsmechanismus durch Ocld auf Genexpressionsebene an den Tagen 2 und 4 nach eSAB handelt, ist rein spekulativ. Diesbezüglich untersuchte die Arbeitsgruppe um Lechuga et al. die veränderte epitheliale Homöostase und die Funktion von AJs und TJs im entzündeten Darm. Es zeigte sich eine Barriere-Dysfunktion im Darmepithel aufgrund von Inflammation, gefolgt von einer Umstrukturierung verschiedener Zellen und Signalmoleküle mit veränderter molekularer Zusammensetzung von TJs und AJs. Es folgte eine erhöhte Passage von Molekülen durch offene interzelluläre Räume, die unter physiologischen Bedingungen nicht durchdringen. Interessanterweise ergab eine beeinträchtigte Funktion der Epithelübergänge jedoch keinen Einfluss auf die Schleimhautentzündung. Dieses Phänomen resultierte aus der globalen Veränderungen der Homöostase von Darmepithelzellen im entzündeten Darm, die eine Reprogrammierung der Transkription von Zellen mit Veränderungen ihrer Zytoskelettarchitektur, speziell Aktin, verursachten. Dabei konnte eine Modulation der Expression verschiedener AJs und TJs nachgewiesen werden (Lechuga et al., 2017). Dieses Beispiel der Homöostase im Darm könnte einen noch verborgenen Mechanismus beschreiben, der auch in der BHS unter neuroinflammatorischen Zuständen zu finden ist. Diesbezüglich wurde in dieser Arbeit die Proteinexpression von Ocld und Cld5 immunhistochemisch anhand von koronaren Gehirnschnitten nach eSAB ermittelt. Hierbei konnte eine verminderte Immunreaktion beider TJs über den gesamten zeitlichen Verlauf auf Proteinebene festgestellt werden, wodurch ein molekulares Korrelat für den BHS-Defekt nach eSAB gefunden und dargestellt wurde. Eine Hochregulierung von Ocld in der qPCR-Auswertung an den Tagen 2 und 4 nach eSAB konnte hiermit auf Proteinebene nicht

bestätigt werden. Ein zuvor erwähnter Kompensationsmechanismus durch Ocld ist daher eher unwahrscheinlich. Um die vorliegenden Daten weiterhin zu bestätigen, wäre die Durchführung von Westernblot-Analysen hilfreich. Die AG um Pang et al. zeigte bereits im Westernblot, dass Ocld und Cld5 nach 48 Stunden am eSAB-Fadenperforationsmodell an der Maus deutlich reduziert waren (Pang et al., 2017). Darüber hinaus ergab eine vergleichbare Studie eine Reduktion von Ocld und Cld5 auch nach 24 Stunden im Mausmodell nach eSAB (Pan et al., 2017). Die erwähnten Arbeiten bestätigen die hier präsentierten Daten für Tag 2 nach eSAB. Weitere Studien konnten eine Reduktion anderer BHS-Moleküle wie die AJs VEC und ZO1 nach eSAB nachweisen (Yuan et al., 2013; Pan et al., 2017). Besonders das AJ Molekül VEC trägt zur Aufrechterhaltung der endothelialen Morphologie bei und ist für die Zellmotilität der Endothelzellen über die Bindung an das aktinsteuerte Zytoskelett verantwortlich (Blecharz-Lang et al., 2008). Dennoch ist Cld5 für den kontrollierten Übertritt von mikromolekularen Substanzen in das ZNS essenziell und bildet den wichtigsten interzellulären Kontakt innerhalb der BHS (Paolinelli et al., 2011). Auch Ocld ist für die Stabilität der BHS über die Bildung von Querverbindungen mit anderen TJs und AJs, sowie für die Aufrechterhaltung der BHS-Funktion entscheidend, in dem der zytosolische C-Terminus von Ocld eine Dimerverbindung mit allen drei ZO-Proteinen und dem zytoplasmatischen TJ-Plaques bildet (Heinemann & Schuetz, 2019; Cummins, 2012). Mäuse mit eingeschränkter Ocld-Expression zeigten einen komplexen Phänotyp von multiplen pathologischen Veränderungen in mehreren Organsystemen, wie etwa chronische Entzündungen der Magenschleimhaut, testikuläre Atrophien oder Kalzifikationen im Hirnparenchym (Saitou et al., 2000). Letzteres ist insbesondere in Bezug auf die Hirnschädigung bei aSAB-Patienten interessant, wobei ein Untergang von Nervengewebe durch neuronale Apoptose und axonale Schädigung nach eSAB bereits in der Maus detektiert wurde (Schneider et al., 2015). Ein Verlust von Ocld nach SAB könnte ein unkontrolliertes Eindringen von Calcium-Ionen durch die BHS verursachen und Verkalkungen im Gehirn auslösen, was das Absterben von Nervengewebe zur Folge hätte.

Die morphologische Charakteristik der TJs Cld5 und Ocld korrespondiert mit dem endothelialen Zellverband auch *In vitro* (Kleinschnitz et al., 2011). Beide Moleküle sind in hohem Maße auch in der cEND-Zelllinie exprimiert und für einen hohen transendothelialen Widerstand von essenzieller Bedeutung.

Demnach trägt die signifikante Herunterregulierung beider TJs entscheidend zur Schädigung der Endothelzellbarriere In vitro bei (Coisne et al., 2011). In vivo wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die endothelzellspezifische IL6-Überexpression eine mögliche Ursache für den Untergang der BHS darstellt. Folglich sollte die Expression von Cld5 und Ocln auch In vitro unter dem Einfluss von rIL6 bestimmt werden. Mittels *real-time* qPCR wurde die Genexpression beider TJs nach 8, 24, und 48 Stunden unter der Behandlung von rIL6 quantitativ analysiert. Die mRNA-Level für Cld5 und Ocln bestätigten ebenfalls zu allen Zeitpunkten eine Herunterregulierung innerhalb der cEND-Zellen. Die Experimente verdeutlichen nochmals, dass dieselben TJ-Moleküle sowohl In vivo als auch In vitro aufgrund inflammatorischer Prozesse herunterreguliert werden. Während In vitro eindeutig IL6 als der Auslöser der gestörten Endothelzellbarriere bestätigt wurde, kann In vivo nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Mediatoren und Signalwege eine Rolle in Bezug auf die Störung des Endothels nach eSAB spielen (Abbott & Friedman, 2012). Obwohl kein eindeutiger Nachweis vorliegt, kann aufgrund der vorliegenden Daten der IL6-Überexpression auf Gen- und Proteinebene bei zeitgleicher Reduktion von Cld5 und Ocln vermutet werden, dass die Hochregulierung von IL6 ein möglicher Auslöser für den BHS-Zusammenbruch im Rahmen der intravaskulären Inflammation nach eSAB darstellt.

4.5 Neuroinflammation im Endothel nach eSAB

Sowohl klinisch als auch experimentell konnten Entzündungsprozesse durch die Hochregulierung essenzieller proinflammatorischer Zytokine nach aSAB detektiert werden, was mit einer frühen Hirnschädigung in Verbindung gesetzt wurde (Wang & Gao, 2018; Pang et al., 2017; Niwa et al., 2016). Allgemein ist bekannt, dass eine Entzündungsreaktion nach aSAB durch die Infiltration des ZNS von peripheren Immunzellen stattfindet. Innerhalb von 10 Minuten nach dem hämorrhagischen Ereignis kann im ZNS bereits eine hohe Anzahl von Neutrophilen nachgewiesen werden (Coulibaly & Provencio, 2020). Die meisten dieser Zellen befinden sich im Mikrogefäßsystem und nicht im Parenchym des Gehirns. Einige Granulozyten dringen jedoch über die BHS in das Gehirnparenchym ein. Interessanterweise korreliert diese Infiltration mit einer Zunahme der Mikroglia-Aktivierung, welche sich in unmittelbarer Nähe der infiltrierten Granulozyten rekrutieren (Provencio et al., 2011). Zusätzlich konnte eine erhöhte mikrogliale Zytokin-Ausschüttung beobachtet werden, was auf eine späte Hirnschädigung nach eSAB hindeutete (Schneider et al., 2015).

Die hier durchgeführten Experimente konzentrierten sich auf die früheren Zeitpunkte der Hirnschädigung nach eSAB (Tag 2 bis Tag 7), wobei die Untersuchung der intravaskulären Inflammation durch die Überexpression der Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ und IL6 im Vordergrund stand. Im Allgemeinen zeigten die *real-time* PCR-Daten eine Überexpression von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ und IL6 an isolierten Kapillaren im zeitlichen Verlauf nach eSAB (Abb. 17). Während die Genexpression von $\text{TNF}\alpha$ an den Tagen 2 und 4 auf eine deutliche Herunterregulierung hinweisen konnte, war $\text{IL1}\beta$ parallel an denselben Zeitpunkten hochreguliert. Ein umgekehrtes Verhältnis wurde an Tag 7 durch eine Überexpression von $\text{TNF}\alpha$ und eine Reduktion von $\text{IL1}\beta$ detektiert, wodurch ein reziprokes Expressionsprofil von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL1}\beta$ erkennbar war (Abb 17 A, B). Die quantitativen *real-time* PCR-Daten für IL6 zeigten über alle Zeitpunkte einen stetigen Anstieg bis Tag 7. Die unterschiedlichen Expressionsprofile deuteten darauf hin, dass alle drei Zytokine an der intravaskulären Inflammation nach eSAB involviert waren und sich möglicherweise gegenseitig beeinflussten. Ein Grund für die Herunterregulierung von $\text{TNF}\alpha$ an Tag 2 und 4 nach eSAB könnte die Überexpression von IL6 sein. Yimin et al. zeigten bereits 2006 am Granulom-Modell der Maus, dass ein Knockout von $\text{TNF}\alpha$ zu einer hohen IL6 -Synthese in der Milz und einer erhöhten Sterblichkeit in der Maus führte. Des Weiteren wurde vermutet, dass die Produktion von $\text{TNF}\alpha$ und IL6 gegenseitig reguliert wird und ein Gleichgewicht beider Moleküle essenziell für die Kontrolle der frühen Phase der Entzündungsreaktion ist (Yimin & Kohanawa, 2006). Die Gruppe kam zu dem Erkenntnis, dass IL6 als proentzündliches als auch als entzündungshemmendes Zytokin einzustufen ist und die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion unterdrückt, wobei ein IL6 -Mangel eine Überproduktion von $\text{TNF}\alpha$ in der infizierten Maus induzierte. Ein $\text{TNF}\alpha$ -/ IL6 -Gleichgewicht wurde somit als der Schlüsselfaktor der angeborenen Immunantwort in Bezug auf eine Entzündungsreaktion interpretiert (Yimin & Kohanawa, 2006). Diesbezüglich konnte die Gruppe von Rochfort et al. nachweisen, dass die Verabreichung von $\text{TNF}\alpha$ in isolierten humanen Endothelzellen die Synthese von IL6 *In vitro* stimulierte. Die Überexpression von IL6 ist demnach durch einen sekundären Mechanismus über die Aktivierung von $\text{TNF}\alpha$ zu erklären. In der gleichen Studie wurde beobachtet, dass die Blockade und die Antagonisierung von IL6 jeweils zu einer Reduktion des Zusammenbruchs der Endothelzellbarriere führte (Rochfort et al., 2016). *In vivo* zeigten Pang et al. ebenfalls eine Überexpression von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ und IL6 nach eSAB an der Maus, wobei es sich jedoch nicht ausschließlich

um eine endotheliale Expression handelte, da für die Analysen ganze Gehirne verwendet wurden (Pang et al., 2017). Die hier vorgelegten Daten dieser Dissertation können die gegenseitige Beeinflussung der Zytokine nach eSAB nicht ausreichend belegen und es kann anhand der zitierten Publikationen nur vermutet werden, dass eine gegenseitige Interaktion der Zytokine nach eSAB stattfindet. Dennoch zeigt diese Arbeit erstmalig die endothelzellspezifische Hochregulation von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ und IL6 im Endothel an den Tagen 2, 4 und 7 nach eSAB in zeitlicher Korrelation eines Untergangs der TJs Cld5 und Ocln . Die erhöhte Genexpression der Zytokine an isolierten Kapillaren offenbart somit einen potenziellen Auslöser für einen BHS-Defekt nach eSAB, wobei der Fokus insbesondere auf die quantitative Überexpression von IL6 im Endothel lag. Hierzu wurde zusätzlich die Immunfluoreszenz von IL6 an isolierten Kapillaren durchgeführt, wobei eine deutliche Signalanhebung in Form von IL6 -Vesikeln innerhalb des Endothels an den Tagen 2 und 4 nach eSAB zu erkennen war (Abb 18).

Neben Gliazellen und Neuronen, synthetisieren außerdem Endothelzellen IL6 im ZNS. Es wurde berichtet, dass die Expression von IL6 im normalen Gehirn sehr gering ist, während sie als Reaktion auf einen Entzündungsreiz dramatisch zunimmt (Jüttler et al., 2003). Diesbezüglich wurde zum ersten Mal der Nachweis erbracht, dass auf Genexpressions- und Proteinebene das Endothel selbst IL6 nach eSAB produziert. Der Einfluss von IL6 auf die BHS wurde in weiterführenden Experimenten auch In vitro untersucht. Wie bereits erwähnt, zeigten die In vitro-Ergebnisse eine Reduktion des TEER und eine verminderte Endothelzellviabilität, als auch eine Herunterregulierung von Cld5 und Ocln in den cEND-Zellen unter der Behandlung mit r IL6 zu allen drei Zeitpunkten. Somit wurde bestätigt, dass r IL6 zu einem Verlust der Endothelzellbarriere führte (Abb. 21).

Des Weiteren konnte unsere Arbeitsgruppe mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) auch die Anreicherung von IL6 im extrazellulären Kompartiment über die Bestimmung der extrazellulären IL6 -Proteinkonzentration nachweisen. Um die Konzentration des IL6 -Proteins zu untersuchen, das von cEND-Zellen freigesetzt wird, wurden die Zellen über 48 Stunden mit r IL6 sowie 50 ng/ml r $\text{TNF}\alpha$ und 10 ng/ml r $\text{IL1}\beta$ behandelt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigte sich eine signifikant erhöhte IL6 -Proteinsynthese im extrazellulären Kompartiment, was durch die Verabreichung von r IL6 ausgelöst wurde (Blecharz-Lang et al., 2018).

Diese In vitro- Daten beweisen die Inflammations-getriggerte IL6-Anreicherung im extrazellulären Kompartiment in den cEND-Zellen, wobei eine Erhöhung von IL6 im Liquor und im Serum bei aSAB-Patienten in klinischen Studien bewiesen wurde (Wang & Gao, 2018; A. Sarrafzadeh et al., 2010).

Cao et al. konnten bereits nachweisen, dass inflammatorische Prozesse über IL6 in Form einer Immunantwort auslöst und zur EBI nach eSAB an der Ratte beiträgt (Cao et al., 2016). In deren Versuchen führte die Applikation von Schwefelwasserstoff (H₂S) zu einer Reduktion der zerebralen Ödembildung und Apoptose von Neuronen, wobei die neurologische Leistungsfähigkeit der Ratten in der Akutphase nach eSAB deutlich verbessert war. Hierbei bestand der Mechanismus von H₂S auf die Reduktion des Hirnödems darin, dass H₂S eine BHS-Störung durch einen MMP-9 induzierten Abbau von TJs inhibierte. Zusätzlich regulierte H₂S die Aquaporin-4-Expression auf Astrozyten herunter und unterdrückte die Gliazellaktivierung als auch die proinflammatorische Zytokin-Sekretion von IL6 (Cao et al., 2016). Die Arbeit um Cao et al. zeigt, dass es essenziell ist, weitere zelluläre Mechanismen zu untersuchen, um ein besseres Verständnis in Bezug auf den Zusammenhang einer erhöhten BHS-Permeabilität und den Einfluss von IL6 nach eSAB zu gewinnen. Daher wäre es für weitere Experimente sinnvoll, die Apoptose von Neuronen, die Aktivierung von Mikroglia und peripheren Immunzellen, als auch inflammatorische Mediatoren weiterhin zu untersuchen. Auch die Analyse des neurologischen Outcomes und das Verhalten der Tiere wären nützliche Schritte, um die Rolle von IL6 nach eSAB besser verstehen zu können.

Eine durch IL6 vermittelte Dissoziation des endothelialen Zellverbandes im humanen Endothelzellmodell mit Verlust der TJs-Interaktion wurde bereits von anderen Forschungsgruppen nachgewiesen (Rochfort et al., 2014). Diesbezüglich könnte ein endothelzellspezifisches IL6-Knockout-Modell an der Maus die Frage beantworten, ob das Fehlen von IL6 einen BHS-Defekt nach eSAB mildert oder sogar verhindert. Zusätzlich wäre auch hier die Bestimmung zellulärer Prozesse unter dem IL6-Knockout, wie die Apoptose von Neuronen oder die Mikroglia-Aktivierung nach eSAB nützlich. Letztendlich ist ein IL6-Knockout auch interessant für die Untersuchung der späten Hirnschädigung nach eSAB, da IL6 nicht nur auf endothelialer Ebene in Bezug auf einen BHS-Zusammenbruch eine Rolle zu spielen scheint, sondern auch auf mikroglialer Ebene mit Aktivierung der neuronalen Apoptose nach eSAB.

Atangana et al. haben anhand von Knockout-Modellen für die Adhäsionsmoleküle ICAM1 und PSGL1 in der Maus gezeigt, dass es in den ersten sieben Tagen nach eSAB zu einer deutlich verringerten Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und dem Endothel kam. Der Knockout der beiden Adhäsionsmoleküle führte zu einer Unfähigkeit für periphere Immunzellen, entweder am Endothel anzudocken oder am Endothel zu rekrutieren. Im Gegensatz dazu wurde bei Wildtyp-Mäusen eine erhöhte Wechselwirkung zwischen den Neutrophilen und dem Endothel nach eSAB festgestellt. Dabei rollten zirkulierende Granulozyten entweder kurz am Endothel entlang oder hafteten dauerhaft. Hier zeigte sich jedoch zu keiner Zeit ein Übertritt von peripheren Immunzellen durch die BHS in das Hirnparenchym nach eSAB (Atangana et al., 2016). In einer vorherigen Arbeit unserer Gruppe konnte bereits eine parenchymale Akkumulation von Mikroglia nachgewiesen werden, wobei ein erhöhter neuronaler Zelltod nach eSAB in Wildtyp-Mäusen an den Tagen 7 und 14 beobachtet wurde (Schneider et al., 2015). Die neuronale Apoptose war für die PSGL1- und ICAM1-Knockout Tiere an den Tagen 7 und 14 nach eSAB deutlich reduziert. Im Gehirnparenchym zeigten sich sowohl eine verringerte Apoptose von Neuronen als auch eine verringerte Akkumulation von Mikrogliazellen. Dieser sogenannte *outside-in*-Effekt beschreibt die Aktivierung des zerebralen Immunsystems über das von außen aktive periphere Immunsystem. Die Ausschaltung der Adhäsionsmoleküle hemmte somit den Effekt des peripheren Immunsystems, was zu einer reduzierten neuronalen Apoptose führte (Atangana et al., 2016). Demnach wurde geschlossen, dass intravaskuläre Entzündungen intrazerebrale Mikroglia aktivieren und zu einer sekundären Hirnverletzung nach eSAB beitragen. Zusätzlich werden periphere Immunzellen am zerebralen Endothel nach eSAB im Wildtyp rekrutiert, wobei dies durch den Knockout von Adhäsionsmolekülen unterdrückt werden kann. Darüber hinaus konnte an humanen Endothelzellen gezeigt werden, dass die Komplexbildung zwischen IL6 und seinem Rezeptor eine erhöhte ICAM1-Expression hervorruft (Romano et al., 1997). Der beschriebene *outside-in*-Effekt könnte auch mit einem IL6-Knockout-Modell untersucht werden, um zu schauen, ob der IL6-Knockout beispielsweise zu einer reduzierten Expression von Adhäsionsmolekülen führt und eine intravaskuläre Entzündung nach eSAB reduziert.

Diesbezüglich zeigten Duchini et al. bereits 1996 an humanen Endothelzellen des Gehirns, dass die proinflammatorischen Zytokine IL6 und TNF α , Veränderungen in der Endothelzell-Morphologie induzierten.

Hierbei beobachtete die Gruppe anhand von Transzytose- und Endozytose-Experimenten eine erhöhte Permeabilität unter dem Einfluss der beiden Zytokine. Bereits damals wurden die Veränderungen der BHS-Permeabilität mit Krankheiten in Verbindungen gebracht, die durch eine erhöhte Zytokinproduktion gekennzeichnet sind (Duchini et al., 1996). IL6 bewirkt als Entzündungsmediator im Endothel eine Rekrutierung von peripheren Immunzellen aus dem Plasma, welche durch das Andocken am Endothel durch weitere Signalkaskaden eine intravaskuläre Inflammation triggern und einen BHS-Schaden hervorrufen können (Rocheffort et al., 2016; Duchini et al., 1996). Im Falle eines IL6-Knockouts würde der beschriebene *outside-in*-Effekt eine verringerte neuronale Apoptose und eine erniedrigte Anzahl von aktivierten Mikroglia zeigen, da das Fehlen von IL6 eine abgeschwächte intravaskuläre Rekrutierung von Immunzellen zur Folge hätte. Diesbezüglich käme es zu einer reduzierten Extravasation von Immunzellen in das Hirnparenchym und letztendlich zu einer schwächeren parenchymalen Inflammation nach aSAB. Die Überexpression von IL6 nach eSAB würde in diesem Fall eher auf einen nachteiligen Effekt in Bezug auf den Pathomechanismus nach aSAB hindeuten. Schließlich wäre anzunehmen, dass IL6 als ein essenzieller Entzündungsmediator und ein wichtiges Botenmolekül zwischen der BHS, den intravaskulären Immunzellen und den Zellen des Gehirnparenchyms vermittelt. Zusammengefasst zeigen die neuen Erkenntnisse in Bezug auf die Neuroinflammation nach eSAB einerseits eine signifikante Überexpression von IL6 im Endothel auf Proteinebene und auf Genexpression an Tag 2 und 4 nach eSAB, wobei zusätzlich anhand des In-vitro-Modells der BHS über die cEND-Zelllinie bestätigt wurde, dass die IL6-Verabreichung zu einer Senkung des TEER und einer reduzierten Endothelzellproliferation führte. Gleichzeitig waren die TJs Cldy5 und Ocld zu allen 3 Zeitpunkten sowohl In vivo als auch In vitro erniedrigt.

4.6 Die endotheliale Expression des IL6R im Gehirn

Die Induktion des IL6R im ZNS wurde bisher in Mikrogliazellen, Neuronen und Astrozyten bestätigt, wobei sympathische Ganglienzellen und chromaffine Zellen der Nebenniere ebenfalls den IL6R In vitro exprimierten (Rothaug et al., 2016; Erta, et al., 2012). Während die GP130 auf allen Zellen des Körpers vorhanden ist, konnte der membrangebundene IL6R außerhalb des ZNS ansonsten noch in Hepatozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen nachgewiesen werden (Wang et al., 2013).

Die Dimerisierung von IL6R und GP130 aktiviert nach Bindung des IL6-Liganden den JAK/STAT Signalweg und die MAPK-Kaskade (Heinrich et al., 2003). Alle Zellen, die jedoch keinen membrangebundene IL6R besitzen, können über den sIL6R aktiviert werden, wobei dieser Vorgang auch als Transsignalweg in der Literatur beschrieben wird (Rose-John, 2012).

Die Präsenz des IL6R im Endothel war bisher umstritten und möglicherweise durch einen Mangel an sensitiven Antikörpern oder Primern in der Vergangenheit zu erklären (Romano et al., 1997). Um diesbezüglich mehr Klarheit zu schaffen, widmete sich unsere Arbeitsgruppe der Aufgabe, die Induktion des IL6R im zerebralen Endothel In vivo und In vitro zu untersuchen. Hierbei konnte eine signifikante Überexpression von IL6R und dem Liganden in Gehirnkapillaren an Tag 2 nach eSAB beobachtet werden. Zusätzlich zeigte sich am In vitro-Modell der BHS, den cEND-Zellen, dass die Verabreichung von IL6 zu einer intrazellulären Erhöhung des IL6-Proteins und somit eine autokrinen Produktion von IL6 stattgefunden hatte (Blecharz-Lang et al., 2018). Durch die Anwendung verschiedener funktioneller Tests wie die Messung des TEER und die Durchführung eines *tube formation Assay* wurde zusätzlich gezeigt, dass IL6-inkubierte cEND-Zellen ihre endotheliale Integrität durch den Verlust von TJs verlieren, wobei dieser Prozess durch die Blockierung des IL6R über einen neutralisierenden IL6R-Antikörper teilweise abgeschwächt werden konnte. Basierend auf den In-vitro-Daten kann die Neutralisierung des IL6R, der spezifisch von Endothelzellen zerebralen Ursprungs exprimiert wird, als potenzielle Strategie zur Verringerung einer BHS-Störung nach aSAB und anderen zerebrovaskulären Störungen angesehen werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmalig sowohl In vivo als auch In vitro die Induktion des endothelständigen IL6R an isolierten Gehirnkapillaren nachweisen, wobei beide Rezeptoruntereinheiten im Endothel unter IL6-Applikation gezeigt wurden und die endotheleigene Induktion des IL6R unter der Anwesenheit der proinflammatorischen Mediatoren IL6, TNF α und IL1 β bestätigt werden konnte (Blecharz-Lang et al., 2018). Das zerebrale Endothel ist demnach nicht von dem sIL6-Transsignalweg abhängig, sondern über den klassischen membranständigen IL6R-Signalweg in der Lage, aktiviert zu werden (Blecharz-Lang et al., 2018). Zusätzlich zeigte die Neutralisation des IL6R eine Stabilisierung der Integrität des Endothels, was zuvor mit rIL6 behandelt wurde und ein Verlust essenzieller TJs zu beobachten war.

In der Ätiologie der aSAB wurde der entzündliche Modulator IL6 und sein Rezeptor IL6R nachgewiesen und definiert, wobei wenig über das Zusammenspiel mit

parenchymalen Zellen des Gehirns und peripheren Immunzellen bekannt ist. Die Rolle des neu entdeckten IL6R im zerebralen Endothel ist in Bezug auf die Entwicklung der EBI nach aSAB noch nahezu unverstanden. Es ist bekannt, dass die Aktivierung des sIL6-Transsignalwegs mit entzündungsfördernden Prozessen im Endothel in Verbindung steht, während der klassische IL6-Signalweg über den membranständigen IL6R regenerative und entzündungshemmende Funktionen stimuliert (Zegeye et al., 2018). Diesbezüglich stellt sich die Frage, ob die Aktivierung des klassischen Weges und die Induktion des IL6R im Endothel die Antwort auf eine intravaskuläre Inflammation ist, um ein Fortschreiten weiterer Entzündungsmechanismen nach aSAB abzuschwächen. Dieser Kontext müsste in weiterführenden Studien unter dem Gesichtspunkt der eSAB aufgegriffen und in Zukunft genauer untersucht werden.

4.7 Ausblick

Die vorliegende Promotionsarbeit zeigt erstmalig die endotheliale Aktivierung von IL6 nach eSAB mit zeitlicher Korrelation eines BHS-Zusammenbruchs anhand der Extravasationsdaten und der Herunterregulierung der TJs Cld5 und Ocld. Die anschließenden In-vitro-Experimente verdeutlichen den Untergang der Endothelzellbarriere in der cEND-Zelllinie im zeitlichen Verlauf nach rIL6-Behandlung, wobei ebenfalls eine erniedrigte Expression von Cld5 und Ocld zu erkennen ist. IL6 verursacht eine erhöhte Permeabilität und einen Verlust des TEER innerhalb des Endothelzell-*Monolayers* durch den Untergang von TJs. Aufgrund des zeitgleichen Auftretens einer erhöhten IL6-Expression und dem Untergang von TJs in isolierten BHS-Kapillaren, trägt möglicherweise auch IL6 nach zu einer BHS-Störung. Durch klinische Studien ist bekannt, dass eine Erhöhung von IL6 im Liquor, im Serum und in extrazellulärer Gehirnflüssigkeit sich negativ auf das klinische Outcome bei aSAB-Patienten auswirkt. In Zukunft könnte IL6 in Bezug auf die frühe Hirnschädigung nach aSAB einen relevanten therapeutischen Ansatz darstellen. Wie bereits erwähnt, könnte die Blockade des IL6R eine potenzielle Strategie für die Hemmung der Neuroinflammation darstellen. Zahlreiche klinische Studien mit Antikörpern gegen den IL6R haben gezeigt, dass die Blockierung der IL6-Signalübertragung bei chronisch entzündlichen Erkrankungen von therapeutischer Bedeutung ist (Tanaka et al., 2012). Der humane IL6-Antikörper Tocilizumab wird bereits erfolgreich für die rheumatische Arthritis eingesetzt und könnte in Zukunft auch im Rahmen der aSAB eine mögliche Therapie darstellen (Ueda et al., 2013).

Darüber hinaus existieren bereits neuere Antikörper, wie der Rezeptor-Antikörper Sirukumab, welcher IL6 auf direktem Weg hemmt und ebenfalls bei Patienten mit rheumatischer Arthritis eingesetzt wird (Avci et al., 2015). Dennoch ist eine solche systemische IL6-Blockade auch mit Nebenwirkungen einschließlich schwerer Infektionen verbunden (Yusof et al., 2013). Vom therapeutischen Aspekt abgesehen, dient IL6 als frühzeitiger Marker zur Vorhersage eines schlechten *Outcome* bei aSAB-Patienten während der ersten 30 Tage nach *onset* der aSAB (Kao et al., 2015). Nach der Feststellung erhöhter IL6-Werte könnten Therapiemaßnahmen bei aSAB-Patienten intensiviert werden, um den klinischen Verlauf und die Prognose zu verbessern, vorausgesetzt ein IL6-Screening wird zum festen Bestandteil in der Intensivdiagnostik.

5. Literaturverzeichnis

Abbott, N. J., & Friedman, A. (2012). Overview and introduction: The blood-brain barrier in health and disease. *Epilepsia*, 53, 1–6.

Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*.

Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41–53.

Abbott, N. J. (2000). Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cellular and Molecular Neurobiology*.

Al-Khindi, T., MacDonald, R. L., & Schweizer, T. A. (2010). Cognitive and functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*.

Allan, S. M., & Rothwell, N. J. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*.

Almutairi, M. M. A., Gong, C., Xu, Y. G., Chang, Y., & Shi, H. (2016). Factors controlling permeability of the blood-brain barrier. *Cellular and Molecular Life Sciences*.

Amasheh, S., Schmidt, T., Mahn, M., Florian, P., Mankertz, J., Tavalali, S., Fromm, M. (2005). Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell and Tissue Research*.

Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.

Armstead, W. M. (2016). Cerebral Blood Flow Autoregulation and Dysautoregulation. *Anesthesiology Clinics*.

Atangana, E., Schneider, U. C., Blecharz, K., Magrini, S., Wagner, J., Nieminen-Kelhä, M., Vajkoczy, P. (2016). Intravascular Inflammation Triggers Intracerebral Activated Microglia and Contributes to Secondary Brain Injury After Experimental Subarachnoid Hemorrhage (eSAH). *Translational Stroke Research*.

- Avci, A. B., Feist, E., & Burmester, G. R. (2015). Biologicals in rheumatoid arthritis: Current and future. *RMD Open*.
- Bamforth, S. D., Kniesel, U., Wolburg, H., Engelhardt, B., & Risau, W. (1999). A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 1, 1879–1888).
- Becher, B., Spath, S., & Goverman, J. (2017). Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*.
- Bederson, J. B., Connolly, E. S., Batjer, H. H., Dacey, R. G., Dion, J. E., Diringer, M. N., Duldner, J. E., Harbaugh, R. E., Patel, A. B., Rosenwasser, R. H. (2009). Guidelines for the Management of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*.
- Blecharz-Lang, K. G., Wagner, J., Fries, A., Nieminen-Kelhä, M., Rösner, J., Schneider, U. C., & Vajkoczy, P. (2018). Interleukin 6-Mediated Endothelial Barrier Disturbances Can Be Attenuated by Blockade of the IL6 Receptor Expressed in Brain Microvascular Endothelial Cells. *Translational Stroke Research*, pp. 1–12.
- Blecharz, K. G., Drenckhahn, D., & Förster, C. Y. (2008). Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(6), 1139–1149.
- Bowen, K. K., Dempsey, R. J., & Vemuganti, R. (2011). Adult interleukin-6 knockout mice show compromised neurogenesis. *Neuroreport*, 22, 126–130.
- Budohoski, K. P., Czosnyka, M., Kirkpatrick, P. J., Smielewski, P., Steiner, L. A., & Pickard, J. D. (2013). Clinical relevance of cerebral autoregulation following subarachnoid haemorrhage. *Nature Reviews Neurology*.
- Bühler, D., Schüller, K., & Plesnila, N. (2014). Protocol for the Induction of Subarachnoid Hemorrhage in Mice by Perforation of the Circle of Willis with an Endovascular Filament. *Translational Stroke Research*, 5(6), 653–659.
- Cahill, J., Cahill, W. J., Calvert, J. W., Calvert, J. H., & Zhang, J. H. (2006). Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Cerebral*

Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 26(11), 1341–1353.

Cao, S., Zhu, P., Yu, X., Chen, J., Li, J., Yan, F., Chen, G. (2016). Hydrogen sulfide attenuates brain edema in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats: Possible involvement of MMP-9 induced blood-brain barrier disruption and AQP4 expression. *Neuroscience Letters*, 621, 88–97.

Coisne, C., & Engelhardt, B. (2011). Tight Junctions in Brain Barriers During Central Nervous System Inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(5), 1285– 1303.

Collinet, C., & Lecuit, T. (2013). Stability and dynamics of cell-cell junctions. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*.

Coulibaly, A. P., & Provencio, J. J. (2020) Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: an Overview of Inflammation-Induced Cellular Changes. *Neurotherapeutics*.

Cummins, P. M. (2012). Occludin: One Protein, Many Forms. *Molecular and Cellular Biology*.

Daneman, R., & Prat, A. (2015). The blood–brain barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.

Das Sarma, J. (2014). Microglia-mediated neuroinflammation is an amplifier of virus-induced neuropathology. *Journal of NeuroVirology*.

Davies, C. A., Loddick, S. A., Toulmond, S., Stroemer, R. P., Hunt, J., & Rothwell, N. J. (1999). The progression and topographic distribution of interleukin-1 beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 19(1), 87–98.

Daou, B. J., Koduri, S., Thompson, B. G., Chaudhary, N., & Pandey, A. S. (2019). Clinical and experimental aspects of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *CNS Neuroscience and Therapeutics*.

De Chiara, G., Marcocci, M. E., Sgarbanti, R., Civitelli, L., Ripoli, C., Piacentini, R., Garaci, E., Grassi, C., Palamara, A. T. (2012). Infectious agents and neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*.

Dejana, E., Corada, M., & Lampugnani, M. G. (1995). Endothelial cell-to-cell junctions. *The FASEB Journal*, 9(10), 910–918.

Dejana, E., Orsenigo, F., & Lampugnani, M. G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 13), 2115–2122.

Del Vecchio, G., Tscheik, C., Tenz, K., Helms, H. C., Winkler, L., Blasig, R., & Blasig, I. E. (2012). Sodium caprate transiently opens claudin-5-containing barriers at tight junctions of epithelial and endothelial cells. *Molecular Pharmaceutics*.

de Wit, N., Vanmol, J., Kamermans, A., Hendriks, J., & de Vries, H. (2016). Inflammation at the blood-brain barrier: The role of liver X receptors. *Neurobiology of Disease*.

Duchini, A., Govindarajan, S., Santucci, M., Zampi, G., & Hofman, F. M. (1996). Effects of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 on fluid-phase permeability and ammonia diffusion in CNS-derived endothelial cells. *Journal of Investigative Medicine*, 44(8), 474–482.

D'Souza, S. (2015). Aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology*.

Eagles, M. E., Tso, M. K., & Macdonald, R. L. (2019). Cognitive Impairment, Functional Outcome, and Delayed Cerebral Ischemia After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurgery*.

Ecker, A., & Riemenschneider, P. A. (1951). Arteriographic demonstration of spasm of the intracranial arteries, with special reference to saccular arterial aneurysms. *Journal of Neurosurgery*.

Edvinsson, L., & Povlsen, G. K. (2011). Late cerebral ischaemia after subarachnoid haemorrhage: Is cerebrovascular receptor upregulation the mechanism behind? *Acta Physiologica*.

Egashira, Y., Zhao, H., Hua, Y., Keep, R. F., & Xi, G. (2015). White Matter Injury After Subarachnoid Hemorrhage: Role of Blood-Brain Barrier and Matrix-

Metalloproteinase-9. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 46(10), 2909– 2915.

Etminan, N., Chang, H. S., Hackenberg, K., De Rooij, N. K., Vergouwen, M. D. I., Rinkel, G. J. E., & Algra, A. (2019). Worldwide Incidence of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage According to Region, Time Period, Blood Pressure, and Smoking Prevalence in the Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurology*.

Erta, M., Quintana, A., & Hidalgo, J. (2012). Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *International Journal of Biological Sciences*.

Flynn, L., & Andrews, P. (2015). Advances in the understanding of delayed cerebral ischaemia after aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *F1000Research*, 4 (F1000 Faculty Rev).

Förster, C., Silwedel, C., Golenhofen, N., Burek, M., Kietz, S., Mankertz, J., & Drenckhahn, D. (2005). Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. *Journal of Physiology*, 565(2), 475–486.

Förster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochemistry and Cell Biology*.

Francoeur, C. L., & Mayer, S. A. (2016). Management of delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Critical Care*.

Gendelman, H. E. (2002). Neural immunity: Friend or foe? *Journal of NeuroVirology*.

Giulian, D., Baker, T. J., Shih, L. C., & Lachman, L. B. (1986). Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *The Journal of Experimental Medicine*, 164(2), 594–604.

Graetz, D., Nagel, A., Schlenk, F., Sakowitz, O., Vajkoczy, P., & Sarrafzadeh, A. (2009). High ICP as trigger of proinflammatory IL-6 cytokine activation in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurological Research*.

Greene, C., Hanley, N., & Campbell, M. (2019). Claudin-5: Gatekeeper of neurological function. *Fluids and Barriers of the CNS*.

Grote, E., & Hassler, W. (1988). The critical first minutes after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 22(4), 654–661.

Hawkins, B. T., & Davis, T. P. (2005). The Blood-Brain Barrier / Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacological Reviews*, 57(2), 173–185.

Heinemann, U., & Schuetz, A. (2019). Structural features of tight-junction proteins. *International Journal of Molecular Sciences*.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical Journal*.

Helbok, R., Schiefecker, A. J., Beer, R., Dietmann, A., Antunes, A. P., Sohm, F., Schmutzhard, E. (2015). Early brain injury after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A multimodal neuromonitoring study. *Critical Care*.

Heldmann, U., Thored, P., Claasen, J. H., Arvidsson, A., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2005). TNF- α antibody infusion impairs survival of stroke-generated neuroblasts in adult rat brain. *Experimental Neurology*, 196(1), 204–208.

Hendriksen, E., van Bergeijk, D., Oosting, R. S., & Redegeld, F. A. (2017). Mast cells in neuroinflammation and brain disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*.

Hillhouse, E. W., Kida, S., & Iannotti, F. (1998). Middle cerebral artery occlusion in the rat causes a biphasic production of immunoreactive interleukin-1 β in the cerebral cortex. *Neurosci Lett*, 249(2–3), 177–179.

Iadecola, C. (2017). The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030>

Ince, C., Mayeux, P. R., Nguyen, T., Gomez, H., Kellum, J. A., Ospina-Tascón, G. A., De Backer, D. (2016). The Endothelium in Sepsis. *Shock*, 45(3), 259–270.

Iovino, F., Molema, G., & Bijlsma, J. J. E. (2014). Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, a putative receptor for the adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to the

vascular endothelium of the blood-brain barrier. *Infection and Immunity*, 82(9), 3555–3566.

Jüttler, E., Tarabin, V., & Schwaninger, M. (2003). Interleukin-6 (IL-6): A Possible Neuromodulator Induced by Neuronal Activity. *Neuroscientist*, 8(3), 268–275.

Kamp, M. A., Dibué, M., Sommer, C., Steiger, H. J., Schneider, T., & Hänggi, D. (2014). Evaluation of α murine single-blood-injection SAH model. *PLoS ONE*.

Kao, H. W., Lee, K. W., Kuo, C. L., Huang, C. S., Tseng, W.-M., Liu, C. S., & Lin, C. P. (2015). Interleukin-6 as a Prognostic Biomarker in Ruptured Intracranial Aneurysms. *PLOS ONE*, 10(7), e0132115.

Kimura, H., Gules, I., Meguro, T., & Zhang, J. H. (2003). Cytotoxicity of cytokines in cerebral microvascular endothelial cell. *Brain Research*.

Kiptoo, P., Calcagno, A. M., & Siahaan, T. J. (2016). Physiological, Biochemical, and Chemical Barriers to Oral Drug Delivery. In *Drug Delivery: Principles and Applications: Second Edition*.

Kleinschnitz, C., Blecharz, K., Kahles, T., Schwarz, T., Kraft, P., Göbel, K., Förster, C. (2011). Glucocorticoid insensitivity at the hypoxic blood-brain barrier can be reversed by inhibition of the proteasome. *Stroke*, 42(4), 1081–1089.

László, F. A., Varga, C., & Dóczi, T. (1995). Cerebral oedema after subarachnoid haemorrhage. Pathogenetic significance of vasopressin. *Acta Neurochirurgica*, 133(3–4), 122–133.

Lechuga, S., & Ivanov, A. I. (2017). Disruption of the epithelial barrier during intestinal inflammation: Quest for new molecules and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.

Leclerc, J. L., Garcia, J. M., Diller, M. A., Carpenter, A. M., Kamat, P. K., Hoh, B. L., & Doré, S. (2018). A comparison of pathophysiology in humans and rodent models of subarachnoid hemorrhage. *Frontiers in Molecular Neuroscience*.

Lee, J. Y., Sagher, O., Keep, R., Hua, Y., & Xi, G. (2009). Comparison of experimental rat models of early Brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*.

Li, Y., Wu, P., Bihl, J. C., & Shi, H. (2020). Underlying Mechanisms and Potential Therapeutic Molecular Targets in Blood-Brain Barrier Disruption After Subarachnoid Hemorrhage. *Current Neuropharmacology*.

Liu, Y., Soppi, V., Mustonen, T., Könönen, M., Koivisto, T., Koskela, A., Vanninen, R. L. (2007). Subarachnoid hemorrhage in the subacute stage: elevated apparent diffusion coefficient in normal-appearing brain tissue after treatment. *Radiology*, 242(2), 518–525.

Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*.

Lombardo, A., Zoerle, T., Zanier, E., Longhi, L., & Stocchetti, N. (2013). Intracranial pressure after subarachnoid hemorrhage. *Critical Care*.

Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine and Growth Factor Reviews*.

Macdonald, R. L., Pluta, R. M., & Zhang, J. H. (2007). Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the emerging revolution. *Nature Clinical Practice. Neurology*, 3(5), 256–263.

MacDonald, R. L., Kassell, N. F., Mayer, S., Ruefenacht, D., Schmiedek, P., Weidauer, S., Pasqualin, A. (2008). Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): Randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial. *Stroke*, 39(11), 3015–3021.

Macdonald, R. L., Higashida, R. T., Keller, E., Mayer, S. A., Molyneux, A., Raabe, A., Vajkoczy, P., Wanke, I., Bach, D., Frey, A., Marr, A., Roux, S., Kassell, N. (2011). Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2). *The Lancet Neurology*.

Macdonald, R. L. (2014). Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nature Reviews. Neurology*, 10(1), 44–58.

Mahajan, C. (2017). Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. In *Essentials of Neuroanesthesia*.

Martin, C. O., & Rymer, M. M. (2011). Hemorrhagic stroke: aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Missouri Medicine*.

Matsumura, K., Kumar, T. P., Guddanti, T., Yan, Y., Blackburn, S. L., & McBride, D. W. (2019). Neurobehavioral Deficits After Subarachnoid Hemorrhage in Mice: Sensitivity Analysis and Development of a New Composite Score. *Journal of the American Heart Association*.

Meyers, P. M., & Connolly, E. S. (2011). Stroke: Disappointing results for clazosentan in CONSCIOUS-2. *Nature Reviews Neurology*.

Mokri, B. (2001). The Monro-Kellie hypothesis: Applications in CSF volume depletion. *Neurology*.

Monje, M. L., Toda, H., & Palmer, T. D. (2003). Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. *Science*, 302(5651), 1760–1765.

Muroi, C., Fujioka, M., Okuchi, K., Fandino, J., Keller, E., Sakamoto, Y., Fujiwara, M. (2014). Filament perforation model for mouse subarachnoid hemorrhage: Surgical-technical considerations. *British Journal of Neurosurgery*.

Nilupul Perera, M., Ma, H. K., Arakawa, S., Howells, D. W., Markus, R., Rowe, C. C., & Donnan, G. A. (2006). Inflammation following stroke. *Journal of Clinical Neuroscience*.

Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse M, Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *Journal of Cell Biology*.

Niwa, A., Osuka, K., Nakura, T., Matsuo, N., Watabe, T., & Takayasu, M. (2016). Interleukin-6, MCP-1, IP-10, and MIG are sequentially expressed in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1).

Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine*, 19(12), 1584–1596.

O’Brown, N. M., Pfau, S. J., & Gu, C. (2018). Bridging barriers: A comparative look at the blood-brain barrier across organisms. *Genes and Development*.

Olmos, G., & Lladó, J. (2014). Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of Inflammation*.

Ostrowski, R. P., Colohan, A. R., & Zhang, J. H. (2006). Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurological Research*, 28(4), 399–414.

Pan, P., Zhang, X., Li, Q., Zhao, H., Qu, J., Zhang, J. H., Chen, Y. (2017). Cyclosporine A alleviated matrix metalloproteinase 9 associated blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in mice. *Neuroscience Letters*, 649, 7–13.

Pang, J., Chen, Y., Kuai, L., Yang, P., Peng, J., Wu, Y., Jiang, Y. (2017). Inhibition of Blood-Brain Barrier Disruption by an Apolipoprotein E-Mimetic Peptide Ameliorates Early Brain Injury in Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Translational Stroke Research*, 8(3), 257–272.

Paolinelli, R., Corada, M., Orsenigo, F., & Dejana, E. (2011). The molecular basis of the blood brain barrier differentiation and maintenance. Is it still a mystery? *Pharmacological Research*.

Peng, J., Wu, Y., Pang, J., Sun, X., Chen, L., Chen, Y., Jiang, Y. (2019). Single clip: An improvement of the filament-perforation mouse subarachnoid haemorrhage model. *Brain Injury*.

Petridis, A. K., Kamp, M. A., Cornelius, J. F., Beez, T., Beseoglu, K., Turowski, B., & Steiger, H. J. (2017). Aneurysmal subarachnoid hemorrhage-diagnosis and treatment. *Deutsches Arzteblatt International*.

Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Müller, S. L., Zuleger, N., Piehl, C., Blasig, I. E. (2008). Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(1), 146–158.

Plesnila, N. (2013). Pathophysiological role of global cerebral ischemia following subarachnoid hemorrhage: The current experimental evidence. *Stroke Research and Treatment*.

Pradilla, G., Chaichana, K. L., Hoang, S., Huang, J., & Tamargo, R. J. (2010). Inflammation and Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage. *Neurosurgery Clinics of North America*.

Provencio, J. J., Altay, T., Smithason, S., Moore, S. K., & Ransohoff, R. M. (2011). Depletion of Ly6G/C+ cells ameliorates delayed cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neuroimmunology*.

Prunell, G. F., Mathiesen, T., Diemer, N. H., Svendgaard, N. A., Dodd, R. L., Steinberg, G. K., Kassell, N. F., Chow, M. M., Dumont, A., Findlay, J. M., Vapalahti, M. (2003). Experimental subarachnoid hemorrhage: Subarachnoid blood volume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three different rat models. *Neurosurgery*.

Ramesh, G., Maclean, A. G., & Philipp, M. T. (2013). Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators of Inflammation*.

Rass, V., & Helbok, R. (2019). Early Brain Injury After Poor-Grade Subarachnoid Hemorrhage. *Current Neurology and Neuroscience Reports*.

Rinkel, G. J. E., & Algra, A. (2011). Long-term outcomes of patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *The Lancet Neurology*.

Rochfort, K. D., Collins, L. E., McLoughlin, A., & Cummins, P. M. (2016). Tumour necrosis factor- α -mediated disruption of cerebrovascular endothelial barrier integrity in vitro involves the production of proinflammatory interleukin-6. *Journal of Neurochemistry*, 136(3), 564–572.

Rochfort, K. D., Collins, L. E., Murphy, R. P., & Cummins, P. M. (2014). Downregulation of blood-brain barrier phenotype by proinflammatory cytokines involves NADPH oxidase-dependent ROS generation: Consequences for interendothelial adherens and tight junctions. *PLoS ONE*, 9(7).

Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N., Fruscella P., Ghezzi P., Faggioni R., Luini W., van Hinsbergh V., Sozzani S., Bussolino F., Poli V., Ciliberto G., Mantovani, A. (1997). Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*.

Rose-John, S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences*.

Rothaug, M., Becker-Pauly, C., & Rose-John, S. (2016). The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.

Rubin, L. L., & Staddon, J. M. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annual Review of Neuroscience*, 22, 11–28.

Saito, K., Suyama, K., Nishida, K., Sei, Y., & Basile, A. S. (1996). Early increases in TNF-alpha, IL-6 and IL-1 beta levels following transient cerebral ischemia in gerbil brain. *Neuroscience Letters*, 206(2–3), 149–152.

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., Tsukita, S. (2000). Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4131–4142.

Sarrafzadeh, A. S., Vajkoczy, P., Bijlenga, P., & Schaller, K. (2014). Monitoring in neurointensive care - The challenge to detect delayed cerebral ischemia in high grade aneurysmal SAH. *Frontiers in Neurology*.

Sarrafzadeh, A., Schlenk, F., Gericke, C., & Vajkoczy, P. (2010). Relevance of cerebral interleukin-6 after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocritical Care*, 13(3), 339–346.

Schneider, U. C., Davids, A. M., Brandenburg, S., Müller, A., Elke, A., Magrini, S., Vajkoczy, P. (2015). Microglia inflict delayed brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neuropathologica*.

Schöller, K., Trinkl, A., Klotowski, M., Thal, S. C., Plesnila, N., Trabold, R., Zausinger, S. (2007). Characterization of microvascular basal lamina damage and

blood-brain barrier dysfunction following subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Research*, 1142(1), 237–246.

Schöller, K., Feiler, S., Anetsberger, S., Kim, S. W., & Plesnila, N. (2011). Contribution of bradykinin receptors to the development of secondary brain damage after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*.

Sehba, F. A. (2015). The rat endovascular perforation model of subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochirurgica, Supplementum*.

Stuart, R. M., Waziri, A., Weintraub, D., Schmidt, M. J., Fernandez, L., Helbok, R., Claassen, J. (2010). Intracortical eeg for the detection of vasospasm in patients with poor-grade subarachnoid hemorrhage. *Neurocritical Care*.

Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-brain barrier: From physiology to disease and back. *Physiological Reviews*.

Tanaka, T., & Kishimoto, T. (2012). Targeting interleukin-6: All the way to treat autoimmune and inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*.

T'Hart, B. A., & Den Dunnen, W. F. (2013). Commentary on special issue: CNS diseases and the immune system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*.

Topkoru, B., Egemen, E., Solaroglu, I., & Zhang, J. H. (2017). Early Brain Injury or Vasospasm? An Overview of Common Mechanisms. *Current Drug Targets*.

Touzani, O., Boutin, H., Chuquet, J., & Rothwell, N. (1999). Potential mechanisms of interleukin-1 involvement in cerebral ischaemia. *Journal of Neuroimmunology*.

Ueda, O., Tateishi, H., Higuchi, Y., Fujii, E., Kato, A., Kawase, Y., Jishage, K. I. (2013). Novel genetically-humanized mouse model established to evaluate efficacy of therapeutic agents to human interleukin-6 receptor. *Scientific Reports*, 3.

Vallières, L., Campbell, I. L., Gage, F. H., & Sawchenko, P. E. (2002). Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(2), 486–492.

Van Gijn, J., & Rinkel, G. J. E. (2001). Subarachnoid haemorrhage: Diagnosis, causes and management. *Brain*.

Vilček, J. (2003). The cytokines. An overview. In *The Cytokine Handbook*.

Wang, Q., Chen, X., Feng, J., Cao, Y., Song, Y., Wang, H., Zhu, Y. (2013). Soluble Interleukin-6 Receptor-Mediated Innate Immune Response to DNA and RNA Viruses. *Journal of Virology*.

Wang, L., & Gao, Z. (2018). Expression of MMP-9 and IL-6 in patients with subarachnoid hemorrhage and the clinical significance. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(2), 1510–1514.

Weimer, J. M., Jones, S. E., & Frontera, J. A. (2017). Acute cytotoxic and vasogenic edema after subarachnoid hemorrhage: A quantitative MRI study. *American Journal of Neuroradiology*.

Wilson, M. H. (2016). Monro-Kellie 2.0: The dynamic vascular and venous pathophysiological components of intracranial pressure. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*.

Wolburg, H., & Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation. *Vascular Pharmacology*.

Yamaki, V. N., Cavalcanti, D. D., Figueiredo, E. G. (2019). Delayed Ischemic Neurologic Deficit after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Asian J Neurosurg*.2019 Jul-Sep; 14(3): 641–647.

Yimin, & Kohanawa, M. (2006). A Regulatory Effect of the Balance between TNF- α and IL-6 in the Granulomatous and Inflammatory Response to *Rhodococcus aurantiacus* Infection in Mice. *The Journal of Immunology*.

Yuan, J., Liu, W., Zhu, H., Zhang, X., Feng, Y., Chen, Y., Lin, J. (2017). Curcumin attenuates blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in mice. *Journal of Surgical Research*, 207, 85–91.

Yusof, M. Y., & Emery, P. (2013). Targeting interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Drugs*.

Zhang, J. H., Pluta, R. M., Hansen-Schwartz, J., Dreier, J., Vajkoczy, P., Macdonald, R. L., Nishizawa, S., Kasuya, H., Wellman, G., Keller, E., Zauner, A., Dorsch, N., Clark, J., Ono, S., Kiris, T., Leroux, P. (2009). Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: Time for a new world of thought. *Neurological Research*.

Zegeye, M. M., Lindkvist, M., Fälker, K., Kumawat, A. K., Paramel, G., Grenegård, M., Ljungberg, L. U. (2018). Activation of the JAK/STAT3 and PI3K/AKT pathways are crucial for IL-6 trans-signaling-mediated pro-inflammatory response in human vascular endothelial cells. *Cell Communication and Signaling*.

Zlokovic, B. V. (2008). The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron*.

6. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Josephin Wagner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Endotheliale Inflammation und Zusammenbruch der Bluthirnschranke nach experimentell induzierter Subarachnoidalblutung“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

15.04.2020

Datum

Unterschrift

7. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Josephin Wagner hatte Anteil an folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Wagner J, Blecharz KG, Schneider UC, Winkler L, Vajkoczy P. Role of interleukin-6 in the brain endothelial dysfunction after SAH. Abstractband der 66. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, 07 – 10. Juni 2015, Karlsruhe. Online verfügbar unter:

<http://www.egms.de/static/de/meetings/dgnc2015/15dgnc295.shtml>

Beitrag im Einzelnen: Ein Teil der präsentierten Ergebnisse beruht auf den von mir in vivo und in vitro durchgeführten Experimente sowie auf meiner statistischen Auswertung innerhalb der vorliegenden Arbeit. Die folgenden Arbeitsschritte wurden von mir für den Vortrag durchgeführt:

- Die Aufarbeitung von Gewebeproben für Blut-Hirn-Schranken (BHS)-Permeabilitätsmessungen an Tag 1 bis 7 nach eSAB mittels Extravasationsbestimmung von Evans blue (quantitativ) in Gewebehomogenaten und (qualitativ) mittels Immunhistochemie.
- Die Isolierung von BHS-Kapillaren aus eSAB-Mäusen erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Kinga Blecharz-Lang und Dr. Lars Winkler. Weiter wurde die Isolierung der Gesamt-RNA und die Transkription in cDNA eigenständig durchgeführt, wonach die Bestimmung der Endothelzell-spezifischen IL6-Expression mittels quantitativer real-time PCR durch mich erfolgte.
- Alle im Vortrag beschriebenen Zellkulturexperimente erfolgten selbstständig unter Supervision von Dr. rer. nat. Kinga Blecharz-Lang, um den Einfluss des rekombinanten IL6-Proteins auf die Endothelzellintegrität der zerebralen Endothel-Zelllinie cEND, in Anwesenheit und ohne den IL6-Antikörper Tocilizumab, zu bestimmen.
- Die detaillierte Ausarbeitung und die Präsentation des Vortrags auf der Jahrestagung der Neurochirurgischen Gesellschaft erfolgte durch meine Person.

Der Abstrakt enthält von mir erhobene Daten aus folgenden Kapiteln dieser Dissertation: 3.5.2 Zeitabhängige Reduktion der cEND-Zellviabilität unter rIL6, 3.5.3 Reduktion des TEER im zeitlichen Verlauf unter rIL6, 3.5.4 Einfluss von rIL6 auf die Genexpression von Cld5 und Ocld in cEND-Zellen.

Publikation 2:

Blecharz-Lang KG, Wagner J, Fries A, Nieminen-Kelhä M, Rösner J, Schneider UC, Vajkoczy P. Interleukin 6- mediated endothelial barrier disturbances can be attenuated by blockade of the IL6 receptor expressed in brain microvascular endothelial cells. Translational Stroke Research, February 2018. Online verfügbar unter:

<https://doi.org/10.1007/s12975-018-0614-2>

Beitrag im Einzelnen: Ein Teil der publizierten Ergebnisse beruht auf den von mir in vivo und in vitro durchgeführten Experimente sowie auf meiner statistischen Auswertung innerhalb der vorliegenden Arbeit. Im Detail flossen folgende von mir ausgeführte Arbeitsschritte und daraus resultierenden und von mir ausgewerteten Daten in die Publikation ein:

- Detaillierte Planung und Ausarbeitung der Studie gemeinsam mit Dr. rer. nat. Kinga Blecharz-Lang und Prof. Dr. Peter Vajkoczy.
- Selbstständiges Operieren unter Anwendung der Fadenperforationstechnik unter dem Operationsmikroskop zur Auslösung einer eSAB an der Maus.
- Die Aufarbeitung von Gewebeproben für BHS-Permeabilitätsmessungen an Tag 2 nach eSAB mittels Extravasationsbestimmung von Evans blue (quantitativ) in Gewebehomogenaten und (qualitativ) mittels Immunhistochemie.
- Pflege und Durchführung von in vitro-Experimenten mit Hilfe der cEND-Zelllinie, sowie die Analyse der Zellviabilität und des transendothelialen elektrischen Widerstands (TEER) unter dem Einfluss des rekombinant verabreichten IL6, sowie die Bestimmung der Tight Junction-Moleküle mittels quantitativer real-time PCR wurden unter Anleitung von Dr. rer. nat. Kinga Blecharz-Lang durchgeführt.
- Beitrag zur kritischen Würdigung der Resultate mit Identifikation der relevanten Aussagen der Studie einschließlich ihrer Limitationen.

- Mitarbeit der graphischen Darstellung der Ergebnisse in Abbildungen und Umsetzung des zur Publikation führenden Manuskripts gemeinsam mit Dr. rer. nat. Kinga Blecharz-Lang.

Im Detail finden sich in der Publikation Ergebnisse aus folgenden Kapiteln dieser Dissertation: 3.2.2 Quantitativer Nachweis der Extravasation von Evans blue, 3.2.3 Immunhistochemie perivaskulärer Extravasation von Evans blue, 3.5.1 Die cEND-Zellviabilität unter dem Einfluss von rIL6, 3.5.3 Reduktion des TEER im zeitlichen Verlauf unter rIL6, 3.5.4 Der Einfluss von rIL6 auf die Genexpression von Cld5 und Ocld in cEND-Zellen.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. Publikationsliste

Intravascular Inflammation Triggers Intracerebral Activated Microglia and Contributes to Secondary Brain Injury After Experimental Subarachnoid Hemorrhage (eSAH). Atangana E, Scheider UC, Blecharz K, Magrini S, Wagner J, Nieminen-Kelhä M, Kremenetskaia I, Heppner FL, Engelhardt B, Vajkoczy P. *Transl Stroke Research* 2017 Apr;8(2):144-156, <http://doi.org/10.1007/s12975-016-0485-3>.

Autocrine release of angiopoietin-2 mediates cerebrovascular disintegration in Moyamoya disease. Blecharz KG, Frey D, Schenkel T, Prinz V, Bedini G, Krug SM, Czabanka M, Wagner J, Fromm M, Bersano A, Vajkoczy P. *JCBFM*, 2017 Apr;37(4):1527-1539. <https://doi.org/10.1177/0271678X16658301>.

Interleukin 6-mediated endothelial barrier disturbances can be attenuated by blockade of the IL6 receptor expressed in brain microvascular endothelial cells. Blecharz-Lang KG, Wagner J, Fries A, Nieminen-Kelhä M, Rösner J, Schneider UC, Vajkoczy P. *Translational Stroke Research*, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12975-018-0614-2>.

Prion pathogenesis is unaltered in a mouse strain with a permeable blood-brain barrier. Annika Keller, Mario Nuvolone, Irina Abakumova, Andra Chincisan, Regina Reimann, Merve Avar, Daniel Heinzer, Simone Hornemann, Josephin Wagner, Daniel Kirschenbaum, Fabian F. Voigt, Caihong Zhu, Luca Regli, Fritjof Helmchen, Adriano Aguzzi. *Plos Pathogens*, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007424>.

Vorträge

66. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, 07 – 10. Juni, 2015, Karlsruhe: Wagner J, Blecharz KG, Schneider UC, Winkler L, Vajkoczy P. Role of interleukin 6 in the brain endothelial dysfunction after SAH. Online verfügbar unter: <http://www.egms.de/static/de/meetings/dgnc2015/15dgnc295.shtml>

10. Danksagung

An erster Stelle danke ich besonders Prof. Dr. med. Peter Vajkoczy für die Möglichkeit, meine Dissertation in der experimentellen Neurochirurgie der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchführen zu können, für das von Ihm gezeigte Vertrauen in meine Arbeit und seine fortwährenden Hilfestellungen bei wissenschaftlichen Problemen.

Ganz herzlichen danken möchte ich Dr. rer. nat. Kinga Blecharz-Lang für die Betreuung meiner Arbeit und die Idee eines spannenden Themas, sowie die produktive und motivierende Zusammenarbeit, welche stets viel Freude hervorgebracht hat. Durch ihr wissenschaftliches Fachwissen, aber auch ihre Geduld und Ausdauer, ermöglichte sie es mir, meine Promotion erfolgreich und mit Freude abzuschließen. Für die immer noch bestehende Freundschaft, die mich auch privat sehr bereichert, danke ich ihr abschließend.

Ein wesentlicher Dank gilt auch den Kollegen und Mitarbeitern des Labors im Aschheim-Zondek-Haus, in deren Umfeld ich stets einen wissenschaftlichen Austausch, aber auch eine freundliche Atmosphäre erleben konnte.

Ich danke ebenfalls PD. Dr. Ulf Schneider, der mich die Technik zur Auslösung der eSAB an der Maus gelehrt hat, aber auch für die zusätzliche unterstützende Betreuung des Projektes.

Ein abschließendes Dankeschön gilt meiner Familie, die mir als treue Wegbegleiterin auch in schwierigen Lebenslagen stets zur Seite stand und mich die Jahre immer unterstützt und motiviert hat, meine Ziele und Träume umzusetzen. Vor allem bin ich dankbar dafür, eine großartige Familie zu haben, die nie aufgehört hat, an mich zu glauben.